

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
EPIDEMIOLOGIA E CONTROLLO DELLE ZONOSI  
Ciclo XXIV**

**Settore Concorsuale di afferenza: 07/H3 – MALATTIE INFETTIVE E  
PARASSITARIE DEGLI ANIMALI**

**Settore Scientifico disciplinare: VET/06 – PARASSITOLOGIA E MALATTIE  
PARASSITARIE DEGLI ANIMALI**

**PATOGENI E ZECCHIE VETTRICI:  
STUDIO EPIDEMIOLOGICO IN PARCHI PUBBLICI  
DELL'EMILIA ROMAGNA**

**Presentata da: Dott.ssa SARA AURELI**

**Coordinatore Dottorato**

**Relatore**

**Prof. GIOVANNI POGLAYEN**

**Prof. MARIA PAOLA TAMPIERI**

**Esame finale anno 2012**

# INDICE

## INTRODUZIONE

3

<b>1 LE ZECCHIE IXODIDAE .....</b>	<b>4</b>
1.1 CLASSIFICAZIONE E CARATTERISTICHE GENERALI DELLE ZECCHIE IXODIDAE.....	5
1.2 MORFOLOGIA ESTERNA.....	7
1.3 MORFOLOGIA INTERNA E FISIOLOGIA .....	12
1.4 BIOLOGIA ED ECOLOGIA .....	16
1.5 ETOLOGIA .....	18
1.6 EPIDEMIOLOGIA.....	21
1.7 PROFILASSI.....	28
1.8 PROTEZIONE PERSONALE DELL’UOMO .....	39
1.9 RUOLO PATOGENO .....	39
<b>2 PIROPLASMOSI .....</b>	<b>48</b>
2.1 CENNI STORICI.....	49
2.2 CLASSIFICAZIONE E DESCRIZIONE.....	54
2.3 CICLO BIOLOGICO .....	61
2.4 ECOLOGIA .....	69
2.5 EPIDEMIOLOGIA.....	72
2.6 PATOGENESI.....	74
2.7 SINTOMATOLOGIA .....	79
2.8 LESIONI ANATOMO-PATOLOGICHE .....	82
2.9 ASPETTI ZOONOSICI.....	83
2.10 DIAGNOSI .....	88
2.11 TERAPIA.....	92
2.12 PROFILASSI.....	96
<b>3 ANAPLASMOSI DA ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM .....</b>	<b>99</b>
3.1 CENNI STORICI.....	100
3.2 CLASSIFICAZIONE E DESCRIZIONE.....	101
3.3 CICLO BIOLOGICO .....	104
3.4 ECOLOGIA ED EPIDEMIOLOGIA .....	106
3.5 PATOGENESI.....	110
3.6 SINTOMATOLOGIA .....	114

3.7	LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE .....	117
3.8	ASPETTI ZOONOSICI.....	118
3.9	DIAGNOSI.....	121
3.10	TERAPIA.....	125
3.11	PROFILASSI.....	126
<b>4</b>	<b>BORRELIOSI DI LYME .....</b>	<b>127</b>
4.1	CENNI STORICI.....	128
4.2	CLASSIFICAZIONE E DESCRIZIONE DELL'AGENTE EZIOLOGICO.....	130
4.3	CICLO BIOLOGICO .....	133
4.4	ECOLOGIA ED EPIDEMIOLOGIA .....	135
4.5	PATOGENESI.....	139
4.6	SINTOMATOLOGIA .....	141
4.7	LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE .....	147
4.8	DIAGNOSI .....	148
4.9	TERAPIA.....	152
4.10	PROFILASSI.....	154
<b>5</b>	<b>MATERIALI E METODI .....</b>	<b>157</b>
5.1	CAMPIONAMENTO DELLE ZECCH.....	158
5.2	RICERCA DI PATOGENI TRASMESSI DALLE ZECCH.....	173
<b>6</b>	<b>RISULTATI.....</b>	<b>184</b>
6.1	CAMPIONAMENTO DI ZECCH.....	185
6.2	RICERCA DI PATOGENI TRASMESSI DALLE ZECCH.....	214
<b>7</b>	<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....</b>	<b>234</b>
7.1	DISTRIBUZIONE DELLE ZECCH.....	235
7.2	RICERCA DI PATOGENI TRASMESSI DALLE ZECCH.....	240
7.3	CONCLUSIONI .....	246
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>248</b>

## INTRODUZIONE

Le zecche sono importanti vettori di microorganismi patogeni (batteri, virus e parassiti), che sono gli agenti responsabili di un ampio gruppo di malattie definite VBD (vector-borne diseases), ovvero malattie trasmesse da vettori, che possono determinare gravi malattie nell'uomo e negli animali. L'aumento, in certe aree, di alcuni animali che possono fungere da serbatoio di queste infezioni o che semplicemente ospitano le zecche vettrici e i cambiamenti ambientali indotti dalle variazioni climatiche e dall'uomo hanno determinato un aumento della circolazione delle zecche stesse e dei patogeni trasmessi. Ad esempio l'aumento degli ospiti mammiferi ha facilitato la diffusione di *Ixodes scapularis* nel nord-est degli Stati Uniti o di *I. ricinus* in Europa e in Italia. Anche gli uccelli migratori possono svolgere un ruolo fondamentale nella diffusione delle infezioni trasmesse da zecche, come ad esempio *Borrelia burgdorferi* s.l., trasportando le zecche infette o fungendo da serbatoio. È ampiamente riconosciuto il fatto che gli uccelli possano contribuire all'instaurarsi di nuovi focolai di malattia di Lyme, la più diffusa tra le malattie trasmesse da zecche dell'emisfero settentrionale. Oltre a questa malattia di notevole impatto zoonotico, le zecche possono trasmettere altre patologie definite "emergenti", ovvero malattie nuove o ri-emergenti la cui incidenza è aumentata negli ultimi 20 anni; è il caso ad esempio delle babesiosi o dell'anaplasmosi da *Anaplasma phagocytophilum*. Queste malattie rivestono una notevole importanza in campo zootecnico ma sta aumentando la loro presenza anche a livello umano, sia a causa dei cambiamenti ecologici che determinano una maggiore distribuzione degli ixodidi, sia per un maggiore interesse per le attività all'aperto che pongono più frequentemente l'uomo a contatto con le zecche vettrici, sia per l'aumento di soggetti più sensibili a questo tipo di infezioni, come ad esempio le persone immunodepresse. Allevatori, forestali, campeggiatori ed escursionisti, sono le classi di popolazione maggiormente a rischio di contrarre malattie trasmesse da zecche.

In questa tesi, in una prima parte introduttiva sono state prese in considerazione le zecche da un punto di vista ecologico ed etologico, con riferimenti particolari alla loro diffusione, ai fattori di rischio di trasmettere patogeni, ai metodi di profilassi e di controllo delle infezioni; successivamente vengono trattate importanti malattie da esse trasmesse quali le piroplasmosi, l'anaplasmosi da *A. phagocytophilum* e la borreliosi di Lyme.

Lo scopo della parte sperimentale di questa tesi è quello di fornire un quadro sulla diffusione delle zecche e di alcuni patogeni trasmessi, attraverso una serie di campionamenti ambientali, condotti a cadenza quindicinale, in alcuni parchi dell'Emilia Romagna, dove non risultano precedenti segnalazioni. Oltre alle zecche prelevate dall'ambiente, ne sono state raccolte altre in fase di alimentazione su varie specie animali e sull'uomo.

Le zecche sono state tutte identificate ed è stata analizzata la loro diffusione nei siti di campionamento sulla base di parametri climatici e ambientali. Su parte di questi vettori sono state condotte indagini molecolari per investigare la presenza di piroplasmii, *A. phagocytophilum* e *B. burgdorferi* s.l. Vengono illustrate le tecniche analitiche cui sono stati sottoposti i vettori e i risultati ottenuti al fine di valutare la diffusione di patogeni che possano costituire un eventuale rischio anche per la salute umana.



**1**

# **LE ZECICHE IXODIDAE**

## 1.1 CLASSIFICAZIONE E CARATTERISTICHE GENERALI DELLE ZECHE IXODIDAE

Le zecche sono degli invertebrati ectoparassiti ematofagi, che da un punto di vista tassonomico possono essere così classificate:

Phylum: *Arthropoda*

Subphylum: *Chelicerata*

Classe: *Arachnida*

Ordine: *Acarina*

Sottordine: *Ixodida*

(Villeville e coll., 1978).

Gli *Ixodida* si differenziano dagli altri sottordini per le seguenti caratteristiche:

- Nella regione del prosoma c'è una particolare struttura flessibile e mobile detta capitulum, mentre negli altri acari è fissa e viene detto gnatosoma. Sul capitulum, ventralmente ai cheliceri, è impiantata una particolare struttura che prende il nome di ipostoma. Questa è presente in forma rudimentale in altri acari ectoparassiti ed è invece ben sviluppata e munita di dentelli retroversi negli *Ixodida*.
- Le zecche si distinguono per la mancata suddivisione in propodosoma e metapodosoma della parte che segue il capitulum che negli *Ixodida* è detta, nel suo insieme, idiosoma. Questo è, ventralmente, caratterizzato dall'apertura genitale e dall'attacco degli arti anteriormente, dall'ano e dagli stigmi respiratori, con cui sboccano all'esterno le trachee, posteriormente.
- Gli stigmi respiratori appaiono come aree cribrose che in diverse specie sono circondate da tratti di tegumento più o meno chitinizzati. Tali stigmi, negli *Ixodida*, si aprono tra il III e IV paio di zampe o posteriormente ad esso ed è per questo che le zecche sono comprese fra gli acari cosiddetti metastigmati.
- Le zecche in tutti gli stadi di sviluppo sono ectoparassiti ematofagi obbligati di vertebrati terrestri. Infine, gli *Ixodida* sono i soli acari in cui l'assunzione di sangue condiziona la muta degli stadi immaturi a quelli successivi, i quali, rispetto ai precedenti, acquistano peso e dimensioni senza uguali fra gli altri acari, le cui forme adulte non superano in lunghezza 1,5 mm, mentre le femmine e talora anche i maschi delle zecche possono raggiungere e superare abbondantemente i 10 mm (Manilla, 1998).

Nel sottordine *Ixodida* si riconoscono attualmente 896 specie, le quali iniziarono verosimilmente a differenziarsi da un unico ceppo ancestrale associato ai rettili durante il periodo caldo-umido del tardo Paleozoico o del primo Mesozoico. Tali specie sono raggruppate in tre famiglie: *Ixodidae*, *Argasidae* e *Nuttalliellidae*.

***Nuttalliellidae***: rappresentata da una sola specie (*Nuttalliella namaqua*) parassita del suricato dalle quattro dita (*Suricatus tetradactylus*), che è l'unico viverride vegetariano presente in Sud Africa. Tale famiglia presenta caratteri intermedi fra le altre due famiglie.

**Argasidae:** comprende circa 193 specie; con un diffuso diverbio circa la classificazione di genere; inoltre 133 argasidi devono ancora essere oggetto di ulteriori studi prima di determinare una classificazione definitiva (Guglielmone e coll., 2010). Sono conosciute come “zecche molli”, in quanto prive di scudi cheratinizzati e inoltre, fatta eccezione per le larve, il capitulum è ventrale e situato in una depressione mediana detta camerostoma, mentre negli Ixodidae esso è anteriore in tutti gli stadi (Manilla, 1998).

**Ixodidae:** comprende la maggior parte delle zecche di importanza economica; distribuite in 14 generi e 702 specie e conosciute come “zecche dure” in quanto presentano scudi chitinizzati (Guglielmone e coll., 2010). I maschi sono provvisti di un unico scudo che riveste l'intera superficie dorsale (scudo dorsale). Ventralmente gli scudi possono mancare (sottofamiglia Haemaphysalinae e genere *Dermacentor*) o essere presenti solo nelle aree circostanti l'ano (sottofamiglie Hyalomminae e Rhipicephalinae) oppure ricoprire l'intera superficie, come avviene nei maschi della sottofamiglia Ixodinae.

Le femmine, invece, sono sempre prive di scudi ventrali e munite solo di uno scudo dorsale limitato all'estrema regione anteriore.

Oltre alle differenze riguardanti la presenza degli scudi e la posizione del capitulum, dal punto di vista anatomico gli Ixodidae si distinguono dagli Argasidae anche per l'apertura genitale che non è sempre a livello delle coxae I come nelle zecche molli. Negli Ixodidae, inoltre, gli stigmata sono sempre ben evidenti dietro il IV paio di coxae con forme e dimensioni varie e talora muniti di prolungamenti sclerificati (code), più accentuati nei maschi.

Il capitulum è di forma estremamente variabile sia per quanto riguarda la sua base, che nelle femmine è caratterizzata dalla presenza delle aree porose, sia per quanto concerne i palpi e le appendici buccali.

A differenza degli Argasidae, che hanno palpi con i quattro articoli ben distinti, negli Ixodidae l'ultimo articolo è piccolo e infossato in una depressione del penultimo, rimanendo così visibile solo ventralmente.

Infine, contrariamente agli Argasidae, che compiono pasti molto brevi, nessuna specie di Ixodidae è polifasica ed ogni stadio compie un solo pasto di sangue, che generalmente è di breve durata nelle larve e può protrarsi invece per molti giorni negli stadi successivi (Manilla, 1998).

In questa tesi ci occuperemo fondamentalmente di zecche appartenenti alla famiglia Ixodidae che comprende, come già detto, quattordici generi: *Amblyomma* (130 specie di cui 17 ancora considerata appartenenti al genere *Aponomma* da alcuni autori), *Anomalohimalaya* (3 specie), *Bothriocroton* (7 specie tutte precedentemente incluse nel genere *Aponomma*), *Cosmiomma*, *Cornupalpatum* e *Compluriscutula* con una specie ciascuno, *Dermacentor* (34 specie), *Haemaphysalis* (166 specie), *Hyalomma* (27 specie), *Ixodes* (243 specie), *Margaropus* (3 specie), *Nosomma* (2 specie), *Rhipicentor* (2 specie) e *Rhipicephalus* (82 specie, incluse 5 appartenenti in precedenza al genere *Boophilus* ora riclassificato) (Guglielmone e coll., 2010).

## 1.2 MORFOLOGIA ESTERNA

Le zecche presentano delle caratteristiche anatomiche esterne specifiche che costituiscono la base dell'identificazione dei diversi generi e specie.

### 1.2.1 CORPO

Il corpo è costituito, come già visto in precedenza, dal capitulum e dall'idiosoma il quale viene ulteriormente suddiviso in podosoma (che comprende le zampe e il poro genitale) e opistosoma, che è posto posteriormente al precedente e porta l'apertura anale e gli stigmi respiratori o pulvilli.

Capitulum e podosoma costituiscono il prosoma, ben evidente negli altri aracnidi, mentre nelle zecche è evidente solo nello stadio embrionale (Sonenshine, 1991).

Il corpo è di forma ovalare, di grandezza variabile dai 2 ai 30 mm, appiattito dorso-ventralmente. Le dimensioni variano normalmente dallo stadio larvale ad adulto, soprattutto nella femmina che aumenta molto il volume corporeo dopo l'ingestione di sangue.

Il rivestimento esterno delle zecche è costituito da un esoscheletro che nella larva appare trasparente essendo formato soltanto da un'epicuticola sottile e da un epitelio monostratificato sottostante. Negli stadi successivi si forma una vera e propria cuticola formata da due strati: superficiale (esocuticola) e profondo (endocuticola); tra questa e l'ipoderma, tessuto che delimita la cavità interna detta emocele, è presente uno strato di cellule secretorie. Nell'emocele sono presenti gli organi del parassita immersi in un liquido incolore di composizione indeterminata (Manilla, 1998). La cuticola diventa più o meno sclerotizzata e forma scudi, placche stigmalie o altre strutture del corpo come auricolae, creste, spine e cornue.

I vari strati sono attraversati da canali che si aprono in pori di varia forma, grandezza e localizzazione, importanti anche questi nell'identificazione della specie. Questi canali hanno la funzione di trasportare le sostanze dall'ipoderma verso lo strato più superficiale della cuticola, dove formano un rivestimento aggiuntivo con funzione protettiva nei confronti del bilancio idrico del parassita (fattore molto importante per la sopravvivenza della zecca).

#### Superficie dorsale del corpo

Un'importante caratteristica distintiva tra Argasidae ed Ixodidae, utile per la classificazione, è la presenza, in queste ultime, dello scudo dorsale a livello dell'idiosoma (Sonenshine, 1991). Nelle Ixodidae lo scudo dorsale è già presente nelle larve, ma diventa evidente nello stadio adulto grazie ai processi di differenziazione. L'idiosoma ha forma ovale con margine posteriore arrotondato e margini laterali convessi che si portano anteriormente formando degli angoli più o meno acuti e arrotondati, detti scapule, che avanzano rispetto al margine anteriore. Da questo punto possono partire dei solchi che hanno varie direzioni e lunghezze, secondo la zona verso cui si portano, delimitando aree di varia grandezza; anche queste caratteristiche vengono sfruttate per l'identificazione delle Ixodidae. Sulla superficie dell'idiosoma ci possono essere punteggiature più o meno numerose e setae. A livello del margine posteriore possiamo trovare solchi e rilievi che vanno a formare dei festoni più o meno visibili a seconda della specie. Possono essere

presenti degli occhi a livello della confluenza tra margini antero-posteriori dello scudo nelle femmine di Ixodidae, mentre nei maschi di questa famiglia, sono sempre a livello laterale (Manilla, 1998).

#### Superficie ventrale del corpo

Nelle Ixodidae il solco anale è una caratteristica importante per l'identificazione: si presenta a forma di U con l'apertura verso la parte posteriore del corpo nella sottofamiglia Ixodinae (prostriati), mentre è a U o a Y con l'apertura verso la parte anteriore del corpo negli altri Ixodidae (metastriati). L'ano è ricoperto da valvole mobili che si aprono e si chiudono (Giangaspero, 1999). Nei maschi Ixodidae possiamo trovare tutto attorno degli scudi sclerotizzati di varia forma e grandezza, importanti nell'identificazione della specie.

Questi scudi vengono identificati secondo la loro posizione come:

- adanale
- sub-anale
- anale
- accessori

(Manilla, 1998).

A livello dei margini della metà anteriore della faccia ventrale, questi scudi sono saldati per formare le coxae, ovvero i primi articoli degli arti. Tra l'apertura genitale e quella anale si trovano i due solchi genitali che circondano l'apertura e proseguono nell'area infra-coxale arrivando fino al solco anale. Sia sui margini laterali che posteriori possiamo trovare i festoni nelle sottofamiglie Haemaphysalinae, Hyalomminae e Rhipicephalinae. Gli stigmata si trovano posteriormente al quarto paio di coxae prossimi ai bordi laterali e di dimensioni maggiori.

Gli stigmata possono rappresentare, inoltre, dei prolungamenti sclerificati, dette code, che si portano verso i bordi laterali.

Altra caratteristica distintiva è rappresentata dal primo articolo degli arti (coxa) saldato ai margini della metà anteriore del corpo che può presentare spine o punte diverse a seconda della specie considerata (Manilla, 1998) (Fig. 1.1).

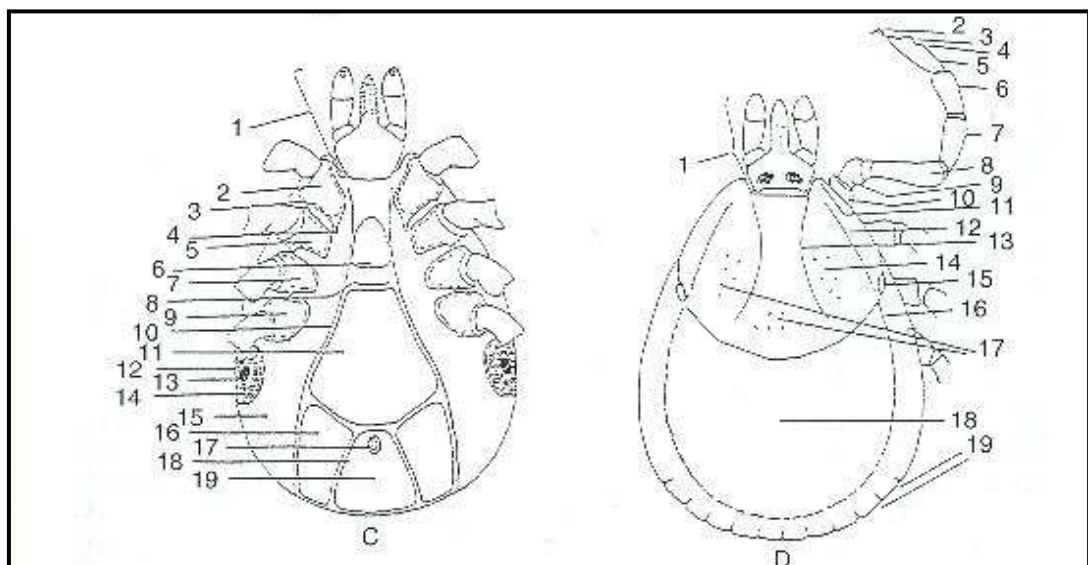


Figura 1.1: Disegno schematico di forme adulte della famiglia Ixodidae; Faccia ventrale di maschio della sottofamiglia Ixodinae (C): 1: Capitulum; 2: coxa I; 3: spina esterna; 4: spina interna; 5: coxa II; 6: scudo pregenitale; 7: coxa III; 8: apertura genitale; 9: coxa IV; 10: solco genitale; 11: scudo mediano; 12 e 14: stigmata; 13: macula; 15: scudo epimerale; 16: scudo adanale; 17: ano; 18: solco anale, 19: scudo anale. Faccia dorsale di femmina della sottofamiglia Hyalomminae (D): 1: Capitulum; 2: pulvillo; 3: gibbosità dorsale; 4: organo di Haller; 5: tarso; 6: pretarso; 7: tibia; 8: femore; 9 trocantere; 10: coxa I; 11: scapula; 12: solco scapolare; 13: solco cervicale; 14: scudo dorsale; 15: occhio; 16: solco marginale; 17: punteggiatura; 18: alloscutum; 19: festoni (Manilla, 1998).

### 1.2.2 TESTA O CAPITULUM

Rispetto ad altri acari, nelle zecche il capitulum è più mobile e come abbiamo già accennato si trova in posizione anteriore negli Ixodidae. Il capitulum è formato da una base impari e mediana, la base è piatta, ricca di particolari di notevole importanza per la classificazione della specie; può avere forma esagonale, trapezoidale, triangolare o rettangolare (Manilla, 1998).

Nel capitulum si valuta la lunghezza rispetto alla larghezza e la forma e le dimensioni delle cornua, che sono degli ispessimenti sclerificati posti dorsalmente tra il margine posteriore ed il margine laterale. Ventralmente tra i margini laterali e posteriori troviamo le auricole, dorsalmente abbiamo punteggiature e setae; solo nella femmina degli Ixodidae sono presenti delle aree maggiormente punteggiate con aspetto cribroso di varia forma e variamente distanziate tra loro la cui funzione sembra correlata all'ovodeposizione (Manilla, 1998).

Sui margini antero-laterali della base sono impiantati, uno per lato, i palpi. Il I articolo è molto più piccolo degli altri e il IV è caratteristicamente molto corto ed infossato in una depressione ventrale del terzo articolo. Gli articoli II e III sono i più sviluppati, variamente conformati e non flessibili tra loro ma saldati lungo suture. Negli Ixodidi la lunghezza dei palpi è un altro carattere distintivo della specie: i palpi corti, come in *Rhipicephalus sanguineus*, hanno una lunghezza pari ai cheliceri, mentre i palpi lunghi, come in *Ixodes ricinus*, li superano (Manilla, 1998).

I margini dei palpi sono paralleli tra loro e in molte specie quelli interni sono scavati per accogliere l'ipostoma. Sui palpi troviamo numerose setae di varia lunghezza, alcune delle quali hanno funzione sensitiva ovvero ricevono stimoli chemiotattili.

Sul margine anteriore della base trovano attacco le appendici buccali che nell'insieme formano il rostro, composto da due cheliceri simmetrici e dorsali ed un ipostoma posto più ventralmente e medialmente (Manilla, 1998).

I cheliceri sono espansioni cuticolari derivanti dai margini anteriori della faccia dorsale della base. Ognuno è composto da tre segmenti: il trocantere, il corpo e l'apotele. Entrambi i cheliceri, vengono utilizzati per lacerare la pelle dell'ospite e consentire l'entrata dell'ipostoma; nei maschi sono inoltre utilizzati anche per aprire l'apertura genitale delle femmine (Sonenshine, 1991).

L'ipostoma è dato dalla fusione a livello mediano di espansioni cuticolari ventrali del primo paio di coxae; la forma varia a seconda della specie di appartenenza. La faccia interna ha una struttura liscia, appiattita che va a formare il pavimento del

canale buccale; all'esterno invece si presenta convessa di varia forma (conica, affusolata o lanceolata) e munita di dentelli retroversi utili alla zecca per ancorarsi all'ospite durante il pasto. Nel maschio questi dentelli possono assomigliare a quelli della femmina, oppure essere ridotti nelle loro dimensioni (Manilla, 1998).

Nelle femmine di tutte le specie, i dentelli sono ben sviluppati e disposti in file longitudinali e possono essere in numero variabile da uno a cinque. Numero e disposizione sono caratteristiche distintive per la tassonomia, infatti, non sono tutti uguali e variano dalla parte apicale dell'ipostoma alla base. Sull'apice i dentelli formano una corona e non sono ben evidenziabili l'uno dall'altro (Fig. 1.2).

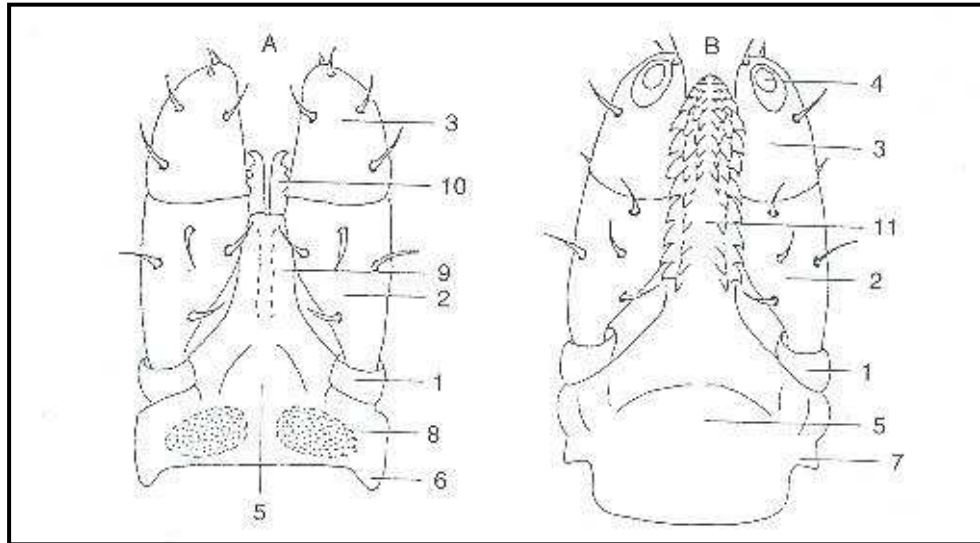


Figura 1.2: Disegno schematico del capitulum. Faccia dorsale (A) e ventrale (B) di femmina della famiglia Ixodidae; 1, 2, 3, 4: articoli I, II, III, e IV dei palpi; 5: base del capitulum; 6: cornua; 7: auriculae; 8: area porosa; 9: guaina dei cheliceri; 10: diti dei cheliceri; 11: ipostoma (Manilla, 1998).

### 1.2.3 ARTI

Le zecche sono caratterizzate da tre paia di zampe nella fase larvale e quattro nella ninfa e nell'adulto. Ogni arto è composto da sei segmenti il primo dei quali è il coxa, di forma e consistenza varia nelle diverse famiglie.

Negli Ixodidae, tranne che per poche specie, i coxa sono grandi, irregolari, più o meno distanziati, ruvidi e sclerificati. Nei margini posteriori i coxae possono inoltre presentare spine di varia grandezza e lunghezza, molto importanti per riconoscere la specie cui appartiene la zecca. Queste spine possono essere interne o esterne secondo l'angolo da cui emergono. La spina interna del coxa I è integra nelle sottofamiglie Ixodinae e Haemaphysalinae, mentre nelle sottofamiglie Hyalomminae e Rhipicephalinae è fessurata e suddivisa in due parti (Manilla, 1998). Importante ai fini classificativi del maschio della zecca è il coxa IV caratteristico in alcune specie, come in *Dermacentor* spp., dove è più sviluppato degli altri, oppure nella specie *Haemaphysalis punctata* dove ha una spina interna ricurva e ha concavità interna. Dopo il coxa troviamo il trocantere, seguito da femore, tibia, tarso e pre-tarso, ognuno dei quali può portare un numero variabile di setae; in particolare sulla

superficie dorsale del tarso del primo paio di zampe è presente una depressione dove è accolto l'organo di Haller (organo di senso), che ha il ruolo fondamentale di ricercare l'ospite, di forma e dimensione varia secondo la specie (Sonenshine, 1991). Sempre a livello dei tarsi, dorsalmente nelle zecche dure, possiamo trovare delle gibbosità oppure il tarso può assottigliarsi gradualmente verso l'estremità dove troviamo due artigli, avvolti in tutti gli stadi di Ixodidae e nelle larve di Argasidae da una sorta di cuscinetto detto pulvillo (Manilla, 1998) (Fig. 1.3).

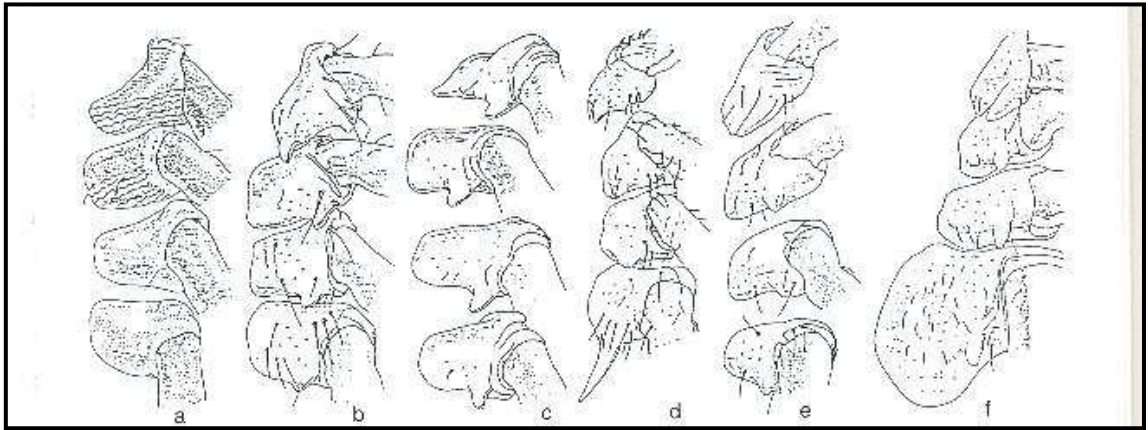


Figura 1.3: Disegno schematizzato di coxae in alcune specie di Ixodidae: Femmina di *Exopialpiger trianguliceps* (a), femmina di *Ixodes ricinus* (b), femmina di *Schaphixodes frontalis* (c), maschio di *Haemaphysalis punctata* (d), maschio e femmina di *Rhipicephalus sanguineus* (e), maschio di *Dermacentor marginatus* (f) (Manilla, 1998)



### 1.3 MORFOLOGIA INTERNA E FISIOLOGIA

Nelle zecche gli apparati circolatorio, respiratorio, escretore e nervoso hanno la morfologia tipica di tutti gli artropodi, mentre l'apparato digerente e il riproduttivo sono caratteristici e riflettono il particolare stile di vita di questi parassiti.

L'apparato circolatorio è di tipo lacunare, ciò significa che tutti gli organi interni sono immersi nell'emolinfa che riempie la cavità corporea interna detta emocele. Il vaso principale è costituito dall'aorta che decorre parallelamente alla parete dorsale del corpo; inoltre è presente un altro vaso posto nella parte più craniale dell'emocele con la funzione di cuore.

L'apparato respiratorio è costituito da un sistema di tubi aeriferi detti trachee, che formano un sistema ramificato che raggiunge tutte le strutture interne del corpo aprendosi verso l'esterno in corrispondenza degli stigmi respiratori o peritremi. Sotto gli stigmi è presente una cavità, detta atrio, che negli Ixodidae è composto da un insieme di camere atriali che comunicano con una camera sub atriale. Ogni trachea si apre nelle camere subatriali e termina con una piccola cellula a forma di stella, i cui rami minuti sono detti tracheole (diametro inferiore a 1 mm). Gli stigmi non sono presenti nelle larve, le quali respirano attraverso la cute, che non è ancora sclerificata (Manilla, 1998).

L'apparato escretore è costituito dai tubi malpighiani, due organi lunghi e sottili, che raccolgono e filtrano i prodotti di rifiuto dell'organismo e sboccano nel tratto tra stomaco ed intestino posteriore, ai lati del sacco rettale. L'osmoregolazione, grazie alla quale viene mantenuto il bilancio idrico, negli Ixodidae avviene mediante la secrezione salivare, durante la quale si ha l'eliminazione di acqua in eccesso assorbita durante la suzione. Quando non si nutrono le zecche riescono a regolare il loro bilancio idrico assumendo o eliminando vapore acqueo nell'ambiente circostante secondo la temperatura e l'umidità relativa (Manilla, 1998).

Il sistema nervoso è composto da una massa celebrale situata nella metà anteriore del corpo, posta ventralmente allo stomaco tra il secondo paio di coxa e attraversata dall'esofago che la divide in due porzioni. La parte pre-esofagea è formata da due gangli cerebroidi e quattro cefalici. Da quest'ultimi si dipartono rami nervosi di cui due destinati ai cheliceri e due per i palpi. In questa porzione sarebbe presente un organo equivalente al cuore negli insetti.

La porzione post-esofagea è formata da otto gangli podali da cui si originano tronchi nervosi per gli arti ognuno dei quali si divide in due rami: uno per i muscoli e uno per i recettori sensoriali. Esiste inoltre un plesso addominale da cui si dipartono nervi per le regioni ventrali, stigmali, genitale, anale, antero-laterale e postero-laterale. Sono presenti inoltre un nervo ottico e un plesso nervoso laterale simpatico che innerva le ghiandole salivari (Manilla, 1998).

Gli organi di senso presenti in questi parassiti sono: occhi, organo di Haller, strutture sensoriali sui palpi, sui cheliceri e a livello di aree porose e infine le setae distribuite in varie parti del corpo diverse secondo la specie.

Gli occhi vengono detti ciechi perché privi dell'organo fotorecettore e consistono in una porzione del tegumento con pigmenti granulosi scuri connessi con fibre nervose (Rizzoli e coll., 2000), ma hanno comunque una certa sensibilità alla luce. Negli Ixodidae, come già detto, gli occhi sono situati sui bordi laterali dello scudo dorsale

delle femmine e a livello dei margini antero-laterali dei maschi.

L'organo di Haller è una struttura molto importante che si trova a livello dei tarsi del primo paio di zampe, con funzione sensoriale. All'interno di quest'organo sono presenti delle setae collegate a terminazioni nervose. L'organo è composto da una fossetta anteriore e da una capsula posteriore; la fossetta è concava e misura 50-70 micron di diametro ed è costituita da sei o sette sensilli. La capsula è circolare di 25-60 micron di diametro, posta longitudinalmente negli Ixodinae e trasversalmente nelle altre specie di Ixodidi e contiene 4-7 sensilli nel suo interno. I sensilli sono formati da setae cave a loro volta costituite da ramificazioni dendritiche associate a fibre nervose; questi organi hanno funzione chemiorecetttrice: in particolar modo il sensillo più distale, a livello della fossetta, è deputato a captare i ferormoni. I sensilli non si trovano solo sull'organo di Haller, ma ce ne sono altri di varia forma e funzione; infatti, nella porzione più distale dell'arto ci sono i recettori degli odori, mentre nella parte media e prossimale del tarso sono presenti meccanocettori e recettori combinati.

I palpi sono anch'essi sede di recettori sensoriali. Su tutti e quattro gli articoli dei palpi, sono presenti dei sensilli che nell'ultimo articolo hanno una particolare disposizione a ciuffi con funzione di chemiorecettori, importanti nella nutrizione per il gusto.

I cheliceri sono percorsi da filamenti nervosi con caratteristiche di chemiocettori e meccanocettori. La funzione principale sembra essere quella di assaggiare i tessuti sottocutanei dell'ospite.

Nelle femmine di Ixodidae, sulla superficie dorsale della base del capitulum, sono presenti inoltre aree porose con proprietà chemio recettive che sembrano essere implicate secondo Manilla (1998) nella ovodeposizione, in quanto sono presenti ghiandole secernenti durante questa fase.

Infine le setae si possono trovare su tutto il corpo, quelle lunghe hanno funzioni chemiorecettive mentre quelle corte funzioni termorecettive.

### 1.3.1 APPARATO DIGERENTE

L'apparato digerente si divide in tre parti: intestino anteriore, medio e posteriore. Anteriormente inizia con la cavità buccale, di forma tubulare, posta tra i cheliceri e l'ipostoma. Si continua con il canale buccale, nel cui fondo troviamo gli sbocchi delle ghiandole salivari, che possono occupare un ampio spazio nella zona anteriore della cavità corporea fino a livello del III-IV paio di coxae.

Le ghiandole salivari consistono in una serie di lobuli acinosi che si originano a livello dei peritremi, si riuniscono in due dotti nella parte anteriore del corpo e sboccano presso l'apparato buccale. Esse svolgono funzione di osmoregolazione tra un pasto e l'altro e sono coinvolte nella secrezione di sostanze cementanti per l'ancoraggio all'ospite, anticoagulanti, vasodilatatori ed enzimi; secernono, inoltre, sostanze farmacologicamente attive che inducono nell'ospite il rilascio di antinfiammatori in grado di prevenire il rigetto da parte dell'ospite stesso e, in alcune specie, anche tossine paralizzanti. Infine è importante il loro ruolo quali siti di sviluppo di stadi infettivi di protozoi parassiti (Fawcett e coll., 1986).

Dopo il canale buccale troviamo il faringe corto e muscoloso che permette, contraendosi ed espandendosi, la suzione del sangue dell'ospite e l'espulsione del

secreto ghiandolare. Esso presenta inoltre una serie di valvole che evitano il rigurgito del sangue nel momento in cui viene pompato verso la parte intermedia. Il faringe sbocca nell'esofago il quale a sua volta comunica con lo stomaco, un organo molto voluminoso in quanto, pur essendo relativamente corto, è costituito da numerose ramificazioni che si dipartono sia anteriormente che posteriormente e terminano ciascuna con due o più lobi a fondo cieco (caeca). L'esofago serve, probabilmente, solo al transito del pasto. Le stesse valvole si aprono poi quando il parassita rigurgita acqua, vari elettroliti e contenuto delle ghiandole salivari riuscendo così a concentrare l'alimento. La digestione del sangue avviene nei fondi ciechi, estensibili durante il pasto, e procede verso la parte posteriore dell'intestino grazie alla muscolatura circolare e longitudinale che ricopre esternamente le cellule epiteliali e che permette i movimenti peristaltici.

Posteriormente lo stomaco si continua con il retto, che va ad aprirsi nel sacco rettale, posto ventralmente alle gonadi. In questa dilatazione confluiscono, inoltre, i tubuli malpighiani attraverso i quali vengono trasportate tutte le sostanze di escrezione dall'emocele. Il sacco rettale si apre poi all'esterno nel poro anale, di forma ellittica, formato da valve semilunari e circondato da un anello cuticolare.

La zecca grazie ai cheliceri che tagliano la cute, penetra con l'ipostoma nel tegumento dell'ospite ancorandosi. Negli Ixodidae i palpi non entrano e si aprono all'esterno aderendo parallelamente alla cute (Aoki e coll., 1984). A seconda della lunghezza del rostro, possono arrivare allo strato basale dell'epidermide o andare oltre. L'ancoraggio è garantito da una sostanza biancastra e fluida composta da lipoproteine e carboidrati; questa sostanza al momento della sua secrezione è liquida e diventa poi solida, in poco tempo, formando il cosiddetto "cemento" (Sonenshine, 1991). Nella figura 1.4 è rappresentata una zecca in fase di alimentazione.

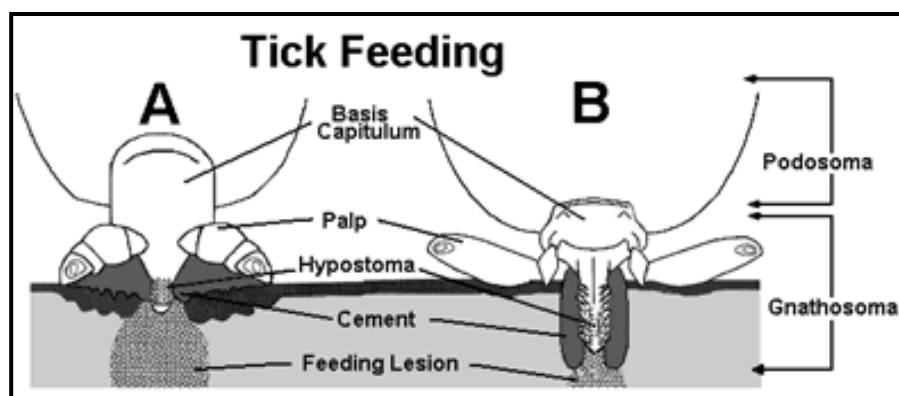


Figura 1.4: Particolare del rostro di una zecca Ixodidae in fase di alimentazione

Nella femmina il pasto avviene in due fasi una iniziale dove essa si nutre molto lentamente ed il suo aumento di volume è poco rilevante ed una seconda fase rapida detta "ingorgamento" dove la femmina aumenta di dimensioni in modo molto evidente (Adelus, 1995); questa fase inizia solo se c'è stata prima la fecondazione che, nel caso degli Ixodidae, avviene sull'ospite (Manilla, 1998).

### 1.3.2 APPARATO GENITALE E RIPRODUZIONE

#### 1.3.2.1 Apparato genitale femminile

L'apertura genitale ha localizzazione variabile pur restando sempre a livello dello spazio infra-coxale. Segue una vagina nella quale si aprono i dotti delle ghiandole accessorie tubulari e a questa segue l'utero che si trova localizzato nella metà anteriore del corpo (Sonshine, 1991) e che si biforca in due ovidutti, i quali si dilatano in un ampolla prima di immettersi nel relativo ovaio che è unico, tubulare e disposto a ferro di cavallo (Manilla, 1998).

Negli Ixodidae vi sono inoltre specifiche cellule vitellogeniche che permettono di supportare la produzione di migliaia di uova dopo il pasto, che è unico ed abbondante, dopo la quale la femmina muore.

#### 1.3.2.2 Apparato genitale maschile

Nel maschio all'apertura genitale segue un dotto nel quale si apre una vescicola seminale che si continua in due deferenti che conducono ai relativi due testicoli. La maturazione degli spermatozoi avviene nelle femmine, dopo l'introduzione di spermatofore; queste sono delle sacche con un lungo collo, dentro le quali si trovano gli spermatozoi. Il maschio introduce il collo della spermatofora nella vagina della femmina e così facendo gli spermatozoi escono (Manilla, 1998).

#### 1.3.2.3 Riproduzione nelle zecche

La riproduzione nelle zecche Ixodidae avviene sull'ospite. L'inseminazione è preceduta dalla liberazione da parte della femmina di un feromone attrattivo per il maschio, il 2-6 diclorofenolo (DCP). Questo è comune a molte specie e non potrebbe pertanto evitare la produzione di ibridi, perciò è solo un feromone di aggregazione o di contatto, mentre il reale meccanismo con cui il maschio riconosce la propria femmina non è stato tuttora chiarito. L'ipotesi più verosimile è che in tale riconoscimento intervenga un secondo feromone specie-specifico prodotto dalle femmine (Manilla, 1998).

La ricerca della compagna adatta alla riproduzione avviene da parte del maschio, che striscia la propria superficie ventrale contro quella della femmina senza superare con le sue estremità anteriori l'apertura genitale. Una volta accertata la conspecificità, le serra il corpo con il ripiegamento degli arti e subito dopo flette il capitulum ventralmente perforando con i cheliceri l'apertura genitale.

A questo punto il maschio si incurva ripetutamente ed emette, dalla propria apertura genitale, un bulbo bianco e trasparente (ectospermatofora) tondeggiante all'estremità libera e ristretto a collo di bottiglia alla base. In pochi secondi nel bulbo viene eiaculato il liquido seminale, lattiginoso e ricco di granuli proteici, facendo diventare il bulbo opaco. Quindi il collo viene tappato da una secrezione della ghiandola accessoria detta endospermatofora, perfettamente adesa alla superficie interna del collo. Servendosi del dito mobile dei cheliceri, che in questa fase appaiono lubrificati di saliva, il maschio fa roteare il bulbo in modo da porre contro l'apertura genitale femminile il collo dell'ectospermatofora, mentre gli spermatozoi si trasferiscono da questa all'endospermatofora che si estroflette e si allunga all'interno della vagina (Feldman-Muhsam e Borut, 1971; 1978).

La femmina copula una sola volta nella vita e poi depone fino a 12.000 uova in una sola emissione che si protrae per molti giorni. Al momento dell'ovodeposizione essa protrude, fra la base del capitulum e il margine anteriore dell'idiosoma, una vescicola (organo di Genè) contenente un liquido ceroso che si riversa sulle uova facendole aderire in masse resistenti alla disidratazione. Al termine dell'ovodeposizione la femmina risulta diminuita di peso fino al 70% (Manilla, 1998).

## 1.4 BIOLOGIA ED ECOLOGIA

Il ciclo biologico nelle zecche Ixodidae è caratterizzato da tre stadi di sviluppo separati da mute:

- larva (esapode);
- ninfa (ottopode senza apertura genitale);
- adulto (ottopode con apertura genitale);

Le Ixodidae sono parassiti obbligati e per passare da uno stadio all'altro necessitano di pasti di sangue, utili anche per l'ovogenesi e la spermatogenesi negli adulti, tranne che per i maschi della sottofamiglia Ixodinae che non si nutrono poiché la spermiogenesi è già completa alla fine dello stadio ninfale (Balashov, 1956).

Le Ixodidae assumono sangue in tre sole occasioni nel corso di una generazione, restando infisse sugli ospiti per il tempo necessario alla replezione di ciascuno dei loro tre stadi. La zecca quando ha infisso le sue appendici buccali nei tessuti dell'ospite, ne assume il sangue alternando le suzioni a secrezioni salivari che svolgono un'importante funzione anticoagulante e vasodilatatrice (Manilla, 1998).

Data la stretta correlazione fra la nutrizione e le fasi del ciclo biologico, la durata di quest'ultimo varia a seconda che le specie dispongano o meno di ospiti adatti alla loro nutrizione durante i periodi di attività, i quali sono a loro volta diversi a seconda delle specie e degli stadi e, comunque, subordinati alle condizioni ambientali. Le zecche possono però ovviare alla mancanza di ospiti o alle avverse condizioni ambientali attraverso uno stadio di quiescenza detto diapausa, che prevede un arresto dei processi metabolici che prolunga la durata dei cicli, rendendoli ancora più variabili. I cicli biologici, indipendentemente dai fattori ambientali che li condizionano, variano da specie a specie, in quanto sono diversi per durata i tempi di nutrizione, di ovodeposizione e soprattutto quelli tra essi interposti, ovvero i tempi di pre-nutrizione, di pre-ovodeposizione e di embriogenesi. La durata dei cicli, infine, dipende anche dalla capacità di alcune specie di compiere mute sugli ospiti anziché sul terreno.

Ultimata l'inseminazione il maschio si stacca dalla femmina e generalmente muore, mentre la femmina si appresta a deporre le uova. In alcune specie il maschio può effettuare ulteriori pasti di sangue e accoppiarsi nuovamente (Giangasper e Otranto, 2010). La fase di deposizione può durare fino a trenta giorni, con un picco di uova prodotte verso il 4°-5° giorno dall'inizio, per poi decrescere rapidamente (Starkoff, 1962). La femmina forma dei grappoli di uova nella parte anteriore del corpo e ne ricopre la superficie con una sostanza vischiosa. Alla fine della deposizione la femmina muore. Le uova iniziano a schiudersi dal 14° giorno dopo la deposizione, oppure possono aspettare fino a tre mesi dopo, mentre nel caso in cui la deposizione sia avvenuta a fine estate, la schiusa avverrà la primavera successiva.

con un intervallo di tempo di 280-350 giorni (Sonenshine, 1991). Nella maggior parte dei casi la schiusa avviene in primavera con la liberazione delle larve esapodi che rimangono vicino al luogo di schiusa aspettando il passaggio di un ospite. Questo stadio rappresenta il momento più critico per le zecche in quanto, se non riescono ad alimentarsi entro 4-5 mesi muoiono secondo Starkoff (1962), mentre secondo Caeiro (1996) il tempo massimo di sopravvivenza della larva senza cibarsi è di circa 13-19 mesi per le larve di *I. ricinus*. La ninfa, a differenza della larva, va alla ricerca dell'ospite e dopo il suo pasto di sangue si trasforma in adulto entro un tempo massimo di 7 mesi (Starkoff, 1962).

La durata del pasto varia dallo stadio larvale a quello adulto: la larva di *Ixodes ricinus*, per esempio, impiega 3-4 giorni, la ninfa 4-7 giorni e l'adulto 7-10 giorni.

L'associazione delle varie specie di Ixodidae con i rispettivi ospiti può essere a bassa specificità, con ampia gamma di ospiti, ad alta specificità, con una cerchia ristretta di ospiti o ad altissima specificità con ospiti appartenenti ad una sola specie o ad un solo gruppo. Esempi di specie ad alta specificità includono: la "zecca dello scoiattolo", *Ixodes marxi*, che vive nei nidi dei suoi ospiti e si nutre esclusivamente sugli sciuridi, e la "zecca del bestiame", *Boophilus microplus*, che si nutre principalmente sul bestiame; viceversa le specie meno specifiche nella scelta dell'ospite sono ad esempio *Amblyomma tholloni* (Walker e Olwage, 1987).

La specificità per un ospite è determinata dalla capacità della zecca di riconoscere e rispondere a specifici composti volatili come la CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, acido lattico e altri composti, rafforzati da stimoli termici caratteristici del corpo ospitante (Sonenshine, 1994).

Le zecche, prima ancora di associarsi agli ospiti, sono legate a particolari ambienti e bioclimi terrestri, ognuno dei quali è subordinato a determinati fattori abiotici, tra cui latitudine, altitudine e piovosità, e fattori biotici, fra i quali svolge un ruolo di grande rilievo la copertura vegetale. Quindi sono le diverse condizioni macro e microclimatiche ad accomunare specie di zecche a specie di ospiti, in modo tale che allo spostamento di un ospite da un ambiente ad un altro, diverse specie di zecche sarebbero in grado di aggredirlo.

Le zecche possono alimentarsi su mammiferi, uccelli e rettili. La distribuzione geografica varia dalle zone sub-artiche, all'equatore a quelle antartiche; gli habitat spaziano dal deserto alle foreste pluviali. Possono sopravvivere persino immerse in acqua marina in quanto spesso si alimentano su uccelli acquatici rimanendo attaccate anche nelle fasi di immersione (Bowman and Nuttall, 2008).

Tra gli Ixodidae esistono molte specie che in tutti i loro stadi di sviluppo hanno bisogno di condizioni microclimatiche costanti, che si realizzano solo in particolari ambienti chiusi e protetti da variazioni sensibili della temperatura e dell'umidità relativa.

Tali specie, necessariamente associate agli ospiti abituali dei rispettivi ambienti, vengono dette endofile, a loro volta distinte, a seconda dell'ambiente che occupano, in foleofile (tane), nidicole (nidi di uccelli), troglobie (grotte) e ipogee (cunicoli e anfratti sotterranei) (Manilla, 1988).

La dispersione delle zecche endofile avviene attraverso quella dei rispettivi ospiti sui quali sono reperibili anche in ambiente aperto in quanto, mentre si nutrono, le zecche non dipendono più dall'ambiente ma solo dalla temperatura dei loro ospiti.

A differenza delle endofile, le specie dette esofile (tutte comprese fra le Ixodidae) sono capaci di guadagnare gli ambienti aperti in tutti i loro stadi in occasione della

ricerca degli ospiti. Le zecche esofile hanno due diverse strategie per trovare l'ospite: una è quella dell'*ambushing*, in cui si arrampicano sui fili d'erba e sugli arbusti e aspettando passi un animale per lasciarsi cadere su di esso; l'altra tecnica è quella dell'*hunting*, in cui le zecche corrono incontro all'animale attivamente. Entrambi questi tipi di comportamenti sono attivati da stimoli di diverso genere: chimici (CO<sub>2</sub>), olfattivi (feromoni), uditivi e tattili come le vibrazioni sul terreno (Maioli e coll., 2009).

Per queste specie un ruolo determinante è svolto dalle condizioni climatiche e dalla copertura vegetale, che garantisce ad esse sia il microclima necessario alle esigenze igrometriche per mantenere il bilancio idrico, sia il supporto per aggredire gli ospiti.

Ne deriva che, per tali specie esofile, lo studio delle relazioni parassita-ospite non può essere disgiunto da quello dei rapporti con la vegetazione, così come rilevato soprattutto da Gilot e coll. (1975; 1979 e 1992), i quali hanno evidenziato la stretta interdipendenza fra alcune specie di Ixodidae e determinati tipi di vegetazione, ricorrendo anche alla cartografia come premessa alle campagne di eradicazione. Tali ricerche hanno anche permesso di distinguere le specie esofile in mesofile e xerofile, a seconda della loro maggiore o minore dipendenza dall'umidità relativa.

Infine, altre specie di Ixodidae sono dette telotrope in quanto sono parassiti legati ad ambienti chiusi nei loro primi stadi (sempre le larve e talora le ninfe) diventando poi esofile da adulte e potendo così parassitare una gamma d'ospiti maggiore.

Tale possibilità è certamente da correlarsi con le strutture dei tessuti di rivestimento, che nei primi stadi sono ancora poco chitinizzate. È così possibile dedurre che non solo le specie ma anche i diversi stadi di una stessa specie dipendono dalle condizioni macroclimatiche e microclimatiche prima ancora che dagli ospiti.

Anche la dispersione delle zecche telotrope ed esofile è legata al movimento dei loro ospiti abituali, ma spesso anche ad ospiti occasionali. Sia gli uni che gli altri possono trasferirle in areali anche molto distanti da quello di origine, ma qui sono di nuovo la disponibilità di ospiti adatti e le condizioni climatiche a determinarne o meno lo sviluppo. È per questo che le specie esofile hanno probabilità di successo maggiori rispetto alle telotrope (Manilla, 1988).

Viceversa, il distacco dagli ospiti per le specie endofile e per gli stadi immaturi di quelle telotrope non allontana la zecca dalle sue fonti di nutrimento, evitando così una riduzione della popolazione. Quello delle femmine delle specie telotrope e di tutti gli stadi delle esofile potrebbe invece comportare tale rischio qualora il distacco avvenisse in ambienti diversi da quelli adatti per la loro sopravvivenza.

## 1.5 ETOLOGIA

Possiamo distinguere, in base al comportamento nella scelta dell'ospite, due categorie di zecche: monotrope e ditrope.

Monotrope: sono le specie di zecca che scelgono, ad ogni fase del ciclo, sempre esemplari appartenenti alla stessa classe.

Ditrope: se uno o entrambi gli stadi immaturi si nutrono su ospiti appartenenti a classi diverse da quelle degli adulti (Adelus, 1995).

In relazione alla ricerca degli ospiti le zecche vengono distinte in monofasiche,

difasiche, trifasiche e polifasiche, a seconda che nei loro cicli la ricerca avvenga una, due, tre o più volte (Manilla, 1988).

Si possono, quindi distinguere:

zecche trifasiche: se ogni stadio è costretto a cercare l'ospite, da cui si distacca dopo il pasto per compiere la muta sul substrato; rappresenta il ciclo più comune e interessa il 90% delle zecche; in breve il ciclo delle zecche a tre ospiti o trifasiche è il seguente:

1. la larva fuoriesce dall'uovo deposto sul suolo;
2. la larva sale su un primo ospite su cui compie il pasto di sangue per poi cadere a terra e mutare a ninfa;
3. la ninfa sale su un secondo ospite, compie il pasto di sangue, cade a terra e muta ad adulto;
4. l'adulto sale su un terzo ospite su cui compie il pasto di sangue, si accoppia e poi scendere a terra per deporre le uova (nel caso della femmina).

L'intero ciclo si svolge per buona parte nell'ambiente creando un serbatoio su cui è difficile intervenire.

zecche difasiche: l'ospite viene aggredito dalla larva, che si distacca come ninfa repleta, e poi dagli adulti; il ciclo delle zecche a due ospiti o bifasiche può essere sintetizzato come segue:

1. la larva fuoriesce dall'uovo deposto sul suolo;
2. la larva sale su un primo ospite su cui compie il pasto di sangue e muta a ninfa;
3. la ninfa si nutre sullo stesso ospite e scende a terra;
4. la ninfa muta ad adulto nell'ambiente;
5. l'adulto sale su un secondo ospite su cui compie il pasto di sangue per poi scendere a terra e deporre le uova.

zecche monofasiche: sono attive solo le larve, le quali, una volta trovato l'ospite, compiono su di esso entrambe le mute abbandonandolo allo stadio di adulto nutrito. Il ciclo in queste specie è breve e in un anno si possono compiere più cicli.

Il ciclo delle zecche ad un ospite o monofasiche può essere quindi schematizzato come segue:

1. la larva fuoriesce dall'uovo deposto sul suolo;
2. la larva sale su un ospite su cui compie il pasto di sangue e muta a ninfa;
3. la ninfa si nutre sullo stesso ospite e muta ad adulto;
4. l'adulto compie il pasto di sangue per poi scendere a terra e deporre le uova.

Il tipo di ciclo biologico influenza la capacità delle zecche di agire come vettori di microrganismi patogeni, ad esempio le zecche trifasiche e difasiche possono trasmettere i patogeni acquisiti durante l'alimentazione larvale al successivo stadio di vita con un fenomeno noto come trasmissione trans-stadiale (Anderson e Magnarelli, 2008) quindi possono trasmettere da un ospite all'altro questi agenti patogeni. Viceversa le zecche monofasiche grazie alla loro specificità, avranno meno occasioni per potersi infettare con microrganismi patogeni e trasmetterli ad altri ospiti, sarà così più facile il loro controllo, anche se alcuni microrganismi possono passare dalla femmina alla progenie con un fenomeno detto di trasmissione trans-ovarica.

Nelle specie monofasiche, come già accennato il ciclo è generalmente rapido, circa 7 settimane, ed è tipico di zecche ad alta specializzazione come per alcune zecche



del genere *Rhipicephalus*. Il ciclo a due ospiti è abbastanza comune per il genere *Hyalomma*.

Nelle specie difasiche e trifasiche il ciclo sarà più lungo, da uno a quattro anni, e ci sarà una maggior probabilità che la zecca trovi un ospite infetto e trasmetta poi l'infezione ad un ospite successivo, il che comporta anche una maggiore difficoltà nel controllo delle malattie da esse trasmesse.

Il comportamento delle zecche Ixodidae in occasione delle loro aggressioni varia a seconda siano endofile o esofile.

Gli Ixodidae endofili sono solifughi, per cui nelle ore diurne restano inattive nei loro anfratti ed aggrediscono l'ospite al buio o, comunque, al riparo dalla luce diretta spesso mentre gli ospiti dormono o covano o sono in letargo.

Gli adulti (e talora le ninfe) delle specie telotrope e tutti gli stadi di quelle esofile, come ad esempio *I. ricinus*, *H. marginatum*, affrontano l'ambiente esterno con modalità ben descritte dalla studiosa slovacca Macicka (1958). I vari stadi si inerpicano sugli steli erbosi, cespugli o varia vegetazione frondosa fino a raggiungere una certa altezza dal suolo dove assumono una posizione di attacco, restando aggrappati con le ultime due o tre paia di zampe e protendendo in avanti il primo paio di zampe e i palpi, cioè le strutture più ricche di sensilli (Manilla, 1998).

Le zecche si dispongono a diversa altezza in dipendenza da vari fattori. Gli adulti, infatti, tendono a salire più in alto sulla vegetazione aumentando la probabilità di incontrare e di attaccarsi a grossi mammiferi quali cervi, carnivori e uomo. Poiché l'equilibrio idrico è un importante fattore limitante per l'attività, le zecche restano sulla pagina inferiore delle foglie o in posizioni tali da proteggersi dall'azione diretta dei raggi solari. Rimangono in posizione di attacco anche per molte ore fino a quando un'eccessiva disidratazione non le costringe alla discesa verso il terreno umido dove possono recuperare l'acqua persa (Sonenshine, 2005).

Le larve, in molte specie, essendo più sensibili al disseccamento (Manilla, 1998), restano più vicine al terreno dove hanno maggiori probabilità di incontrare piccoli mammiferi, uccelli terricoli e altri piccoli ospiti vertebrati (Sonenshine, 2005).

Restano in tale posizione finché un qualsiasi corpo non entra nel loro campo di recezione sensoriale provocando il brusco abbandono da parte delle zecche dei loro supporti, sui quali tornano ad inerpicarsi se il tentativo di aggressione risulta infruttuoso. La zecca risponde a una grande varietà di stimoli quali ombre (forme scure sullo sfondo luminoso del cielo), vibrazioni, odori, stimoli tattili e altri stimoli che possono indicarle la presenza dell'ospite. La zecca, ricevuto lo stimolo, estendono antero-lateralmente gli arti anteriori aggrappandosi all'ospite (Sonenshine, 2005).

Il metodo di trascinamento per la raccolta ambientale delle zecche sfrutta questo comportamento: le zecche si aggrappano al tessuto non distinguendolo in un primo momento da un ospite vivente.

Anche il suono è in grado di attrarre le zecche. I suoni prodotti dai cani attirano *Rhipicephalus sanguineus*, zecca del cane, mentre i suoni emessi da bovini sono noti per attrarre le larve della zecca del bestiame, *Boophilus microplus* (Sonenshine, 2005). I sensilli olfattivi a livello di organo di Haller possono venir eccitati da varie sostanze; in uno studio condotto da Leonovich (2004) sono stati rilevati nella lana e nel pelo bovino, utilizzando tecniche cromatografiche, i principi attivi volatili in grado di attivare i sensilli esaminati. Un tipo di recettore, presente in questo organello, ha risposto solo ai derivati fenolici, (come *o*-clorofenolo, *o*-bromofenolo, *o*-metilfenolo,

2,6-diclorofenolo, 2,6-dibromofenolo, 2,4,6-triclorofenolo), l'altro tipo di recettore ha risposto solo alla presenza di  $\gamma$ -valerolactone. Si presume che queste cellule recettrici svolgano un ruolo importante nelle fasi di riconoscimento dell'ospite.

In generale i lattoni sono trovati come componenti emesse dal pelo di mammiferi, inclusi gli esseri umani (Goetz e coll., 1988; Flood e coll., 1989; Steullet, 1993). Probabilmente, una combinazione di questi stimoli informa la zecca sull'avvicinamento dell'ospite.

La reazione comportamentale, naturalmente, non dipende solo da queste informazioni, e altri sensilli nell'organo di Haller possono essere coinvolti; un maggior sviluppo di questi sensilli in zecche del genere *Ixodes*, può essere spiegato dalla necessità di questo parassita di percepire da lontano l'ospite per prepararsi all'eventuale attacco (per prendere la postura attiva) (Leonovich, 2004). L'abbondanza della vegetazione rende impossibile l'uso di biossido di carbonio come segnale di avvicinamento quando la distanza zecca-ospite è elevata. In queste circostanze, il segnale proveniente da un ospite potenziale deve essere diverso da odori vegetali naturali e deve essere una sostanza piuttosto volatile, come i ferormoni che sono in grado di fornire le informazioni direzionali che portano le zecche al bestiame o ad altri ospiti ungulati (Barré e coll., 1997). I composti fenolici e lattoni, essendo componenti volatili di vertebrati sono particolarmente adatte per questo scopo.

L'attività sugli steli inizia, a seconda della specie e dell'areale di distribuzione, in varie ore del giorno tranne in quelle più calde, per cui dove la temperatura ambientale rimane elevata per tutto l'arco della giornata le zecche sono attive solo di notte.

Il risultato di questi diversi comportamenti legati alle diverse condizioni climatiche ed alle varie esigenze delle specie di Ixodidae è la sincronizzazione tra i periodi di attività delle zecche e quelli degli ospiti. Tale sincronizzazione è indispensabile sia per le specie endofile che per le esofile e, qualora non sia attuabile, tale handicap viene superato grazie ad un più veloce ciclo di sviluppo a alla diapausa (Macicka, 1958).

## 1.6 EPIDEMIOLOGIA

Negli ultimi anni la percezione generale è quella di un aumento della diffusione delle zecche dal loro ambiente naturale a quello domestico con un aumento delle infestazioni non solo su animali domestici e selvatici, ma spesso anche sull'uomo.

E' probabile che l'ecologia delle zecche e di conseguenza, l'epidemiologia delle malattie trasmissibili da zecche, sia in stretta relazione con la popolazione umana.

Nuove associazioni tra ospiti e zecche si stanno sviluppando intensificando la dinamica epidemiologica di alcune malattie da zecche. Le zecche si adattano ai cambiamenti ambientali e si sono dimostrate molto abili a diffondersi e a mantenersi stabili in determinati ambienti rispetto ad altri parassiti in competizione per lo stesso territorio.

La distribuzione e la diffusione delle zecche nella popolazione animale dipende dall'ecologia degli artropodi, dalle dinamiche della popolazione ospite a dal grado di associazione tra zecche e ospite, le zecche infatti possono avere molti ospiti diversi

in grado di mantenere o accelerare il loro ciclo biologico (Genchi e Manfredi, 1999). Secondo Gray e coll. (2009), ci sono diversi fattori di distribuzione e diffusione delle zecche tra cui i mutamenti climatici, che hanno influenzato negli anni la sopravvivenza delle zecche con un effetto diretto sulla loro distribuzione e diffusione. I mutamenti climatici possono inoltre influenzare, con effetto indiretto, la sopravvivenza delle zecche, modificando il tipo di vegetazione e l'abbondanza delle specie ospite.

I cambiamenti climatici e la durata delle stagioni quindi colpiranno direttamente la sopravvivenza, l'attività e lo sviluppo delle zecche, però non ci sono dati evidenti che dimostrano che un aumento di temperatura aumenti l'abbondanza delle zecche semplicemente incrementando il tasso di sviluppo, ma piuttosto variazioni nei tassi di sviluppo renderanno disponibili raggruppamenti di zecche in differenti finestre di diapausa (in gran parte determinate dalla lunghezza del giorno), cambiando quindi i modelli di attività stagionali e alterando significativamente la lunghezza della generazione (Gray, 2008).

Più complicati sono gli effetti indiretti del mutamento climatico. Per esempio, il clima colpirà la vegetazione, che può influenzare in molti modi il numero delle zecche nel territorio. Una vegetazione rigogliosa e densa è generalmente utile alla sopravvivenza della zecca essendo inoltre un fattore positivo per lo sviluppo delle specie ospiti, come cervidi, roditori e uccelli (Gray, 2008).

Nel rapporto EFSA 2010 sulla distribuzione delle zecche e delle malattie da loro trasmesse in Europa e nel Bacino del Mediterraneo, (AA.VV., 2010) nei fattori che influenzano la distribuzione e diffusione delle zecche sono inseriti oltre ai sopra citati mutamenti climatici, fattori quali il movimento degli uccelli migratori, che possono trasportare e diffondere questi parassiti, le tecniche zootecniche, le specie selvatiche ed esotiche introdotte nell'ambiente e il movimento della popolazione umana.

Prendiamo come esempio i tre specie di zecche dure più diffusi in Italia: *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes ricinus* e *Dermacentor marginatus*.

### 1.6.1 RHIPICEPHALUS SANGUINEUS

*R. sanguineus* viene detta anche "zecca del cane" perché in quest'ospite si ritrova molto frequentemente (Fig. 1.6), è diffusa in tutte le regioni d'Italia e predilige un ambiente urbano.

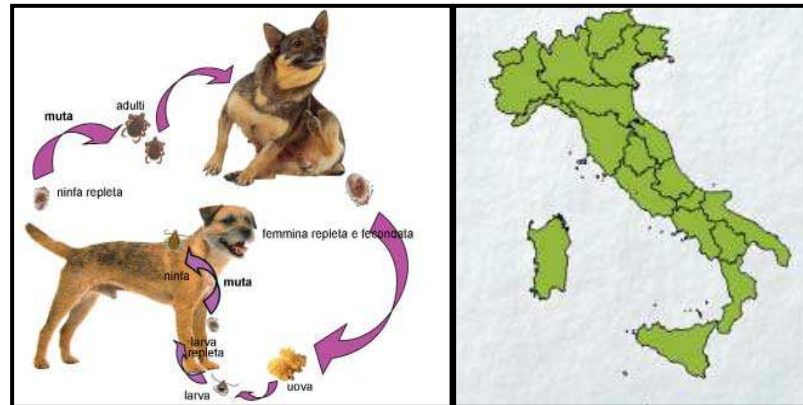


Figura 1.5: Ciclo biologico di *R. sanguineus* e distribuzione in Italia (Iori e coll., 2005).

È una zecca di medie dimensioni, di colore bruno-giallastro o bruno-rossastro. Il gruppo di *R. sanguineus* comprende diverse specie di zecche. Due specie di questo gruppo sono molto simili a *R. sanguineus* e sono *R. camicasi* e *R. turanicus*.

*R. sanguineus* è probabilmente la zecca più diffusa ed è all'incirca presente tra le latitudini di 50° N e 30° S, e la sua preferenza per i cani ha facilitato la sua distribuzione in tutto il mondo (Walker e coll., 2000).

In condizioni favorevoli questa specie può parassitare anche erbivori domestici che vivono nello stesso ambiente del cane (bovini, equini, ecc.). La possiamo ritrovare su carnivori selvatici, roditori, lagomorfi ed insettivori che possono agire come serbatoio in alcune zone rurali (Stella e coll., 1988).

La distribuzione in tutto il mondo e l'ubiquità di *R. sanguineus* sono caratteristiche distintive, il che implica che essa è in grado di sopravvivere in un'ampia serie di habitat potenziali (Yoder e coll., 2006).

In Europa in condizioni naturali la sua attività va da marzo a settembre; tuttavia poiché gli animali domestici vivono in case o in ricoveri, le zecche si sono adattate ad un ciclo vitale continuo (Maroli e coll., 1996).

Infatti le zecche appartenenti alla specie *R. sanguineus* sono spesso endofile e anche se sono in grado di sopravvivere in ambienti aperti (soprattutto in zone tropicali e subtropicali), sono adattate a vivere in canili e nelle case, quindi vivono spesso in ambienti chiusi con una forte tendenza a risalire i muri delle case infestate. Si possono inoltre nascondere in ogni tipo di crepe, di solito vicino al luogo di riposo dell'ospite (Dantas-Torres, 2008). Questo comportamento endofilo è atipico fra le zecche del genere *Rhipicephalus*, che di solito sono interamente esofile (Estrada-Peña e coll., 2004). Recentemente è stato dimostrato che *R. sanguineus*, per sopravvivere, ha minor necessità di un habitat ricco di umidità, e questo facilita il suo propagarsi all'interno di aree che sono sfavorevoli per il mantenimento dell'equilibrio idrico.

Dal momento che questa zecca è principalmente endofila, non presenta una rigida stagionalità: la durata del ciclo di vita di *R. sanguineus* può variare da paese a paese e da regione a regione e può completarsi e portare a completamento anche due o più generazioni in un anno (Dantas-Torres, 2008).

Secondo uno studio sulle specie di zecche infestanti i ruminanti condotto da Manfredi e coll. (1999) in Liguria che ha riscontrato questa zecca rispettivamente nel 38% e nel 33% degli animali infestati, si evidenzia che *R. sanguineus* si è adattato

molto bene a nutrirsi sia su ovini che su caprini. Questo suggerisce che la specie è spesso in grado di mantenersi in ambienti rurali, anche se il più importante habitat sembra essere quello domestico, urbano e peri-urbano dove c'è abbondanza di cani.

In riferimento alla segnalazione di *R. sanguineus* sugli ovi-caprini, precedentemente erano però stati espressi dubbi da parte di Ghirotti e Maroli (1997) sull'attribuzione di questo parassita alle specie ovi-caprine. Gli autori avevano ipotizzato che fossero stati erroneamente identificati come *R. sanguineus* soggetti appartenenti alla specie di *R. turanicus*. Anche se erroneamente identificati è comunque probabile che l'incremento della popolazione canina, in sinergia con l'adattabilità di *R. sanguineus* per altre specie ospite abbia consentito la diffusione di queste zecche verso diversi habitat e diversi tipi di ospiti in particolare dove questi condividono lo stesso ambiente con i cani.

L'uomo può essere parassitato quando manca l'ospite naturale o se le zecche sono presenti in concentrazioni tali da dover cercare altri ospiti per sopravvivere. Questa zecca avendo il rostro corto predilige zone con cute sottile, come l'interno del padiglione auricolare, attorno all'ano o sotto la coda. Il ciclo di questa specie è condizionato, come anche per altre specie, dalla temperatura; la deposizione avviene tra i 15-40°C, mentre la schiusa tra i 18-38°C. La durata di un ciclo può essere di 5-6 mesi, però nel caso in cui le zecche siano costrette a lunghi periodi di diapausa l'intero ciclo si prolunga anche di un anno (Soulsby, 1982) o più. Il digiuno negli adulti può durare fino a 19 mesi, nelle larve e nelle ninfe invece fino a 4 mesi (Manilla, 1998). Secondo Caeiro (1996) il digiuno nelle larve può durare fino a 8-9 mesi mentre per le ninfe può durare fino a 6 mesi.

<i>RHIPICEPHALUS SANGUINEUS</i>			
	GIORNI	SETTIMANE	MESI
Periodo di pre-ovodeposizione			
Durata dell'ovodeposizione	15-17		
Tempo di schiusa	17-30		
Tempo impiegato dalla larva per nutrirsi	2-6		
Tempo impiegato dalla larva per mutare in ninfa	5-23		
Tempo impiegato dalla ninfa per nutrirsi	4-9		
Tempo impiegato dalla ninfa per mutare in adulto	11-73	8-28	
Tempo impiegato dalla femmina adulta per nutrirsi	6-21		
Tempo di sopravvivenza della larva senza cibarsi			8½
Tempo di sopravvivenza della ninfa senza cibarsi			6
Tempo di sopravvivenza dell'adulto senza cibarsi			20

Tabella 1.1: Tempistiche del ciclo di *R. sanguineus* (Caeiro, 1996).

I periodi di massima attività degli adulti sono in luglio e settembre, mentre ad aprile si trovano le larve, che aspettano il passaggio dell'ospite. Oltre alla temperatura sullo sviluppo incide il fotoperiodo: un aumento di ore di luce "risveglia" le zecche dal torpore invernale, stimolandole a risalire in superficie per cercare un ospite su cui nutrirsi. Questa specie di zecca è vettore di molti agenti patogeni come: *Babesia canis*, *B. vogeli*, *B. gibsoni*, *Ehrlichia canis*, *Haepatozoon canis*, *Rickettsia conori* (Giangaspero, 1999).

### 1.6.2 *IXODES RICINUS*

*Ixodes ricinus* è una specie trifasica, comune nelle zone umide di tutti i paesi europei. La specie si trova in boschi di latifoglie e di conifere dove sono presenti animali selvatici come caprioli, cervi e volpi, che rappresentano gli ospiti principali, e in pascoli di bovini e ovini, di solito in alta quota e in zone ad alta piovosità. È la specie più comunemente incontrata nella maggior parte dell' Europa centrale, occidentale e settentrionale. Questa specie è presente in Irlanda, Gran Bretagna, Scandinavia, Finlandia e Russia occidentale e il suo areale di diffusione si estende attraverso l'Europa continentale verso sud nell'area mediterranea, nel Nord Africa e verso est fino nell'Iran.

La presenza di *I. ricinus* in Nord Africa è limitata principalmente alle aree più fresche e piovose (precipitazioni di oltre 800 mm/anno) della regione mediterranea (Estrada-Peña e coll., 2004; Keirans e Durden, 2005).

Nel nostro paese è stata segnalata in tutte le regioni (Fig. 1.8), le rare segnalazioni in Sardegna sono da ascrivere secondo Manilla (1998) a *Ixodes gibbosus*.

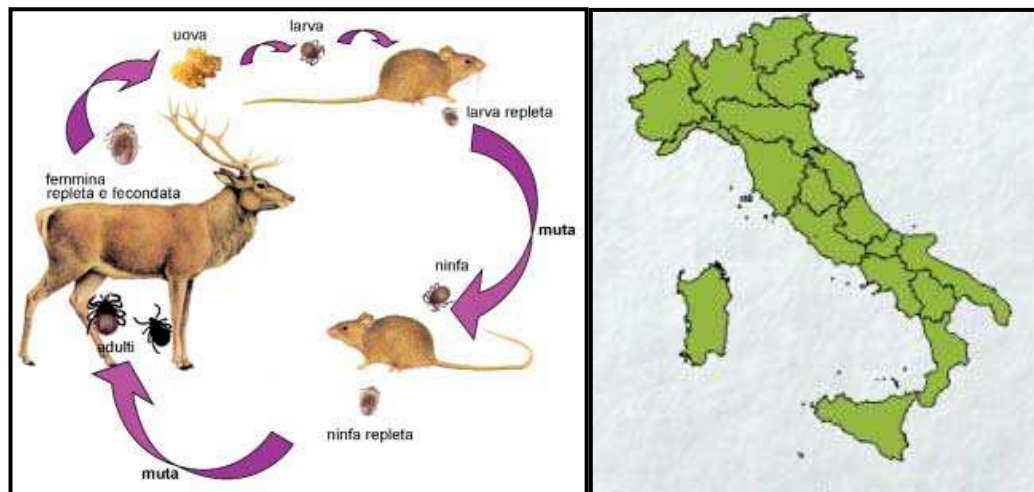


Figura 1.6: Ciclo biologico di *I. ricinus* e distribuzione in Italia (Iori e coll., 2005)

Questa specie predilige un microclima fresco ed umido, anche perché resiste alla disidratazione solo qualche giorno; infatti la piovosità di certi periodi dell'anno ne favorisce la diffusione. *I. ricinus* è una zecca a tre ospiti (Fig. 1.8) che si comporta da zecca endofila durante la fase larvale e da zecca esofila durante le fasi ninfali e di adulto. Quando la temperatura aumenta e l'umidità diminuisce assume, a tutti gli stadi, un tipo di vita endofilo.

*I. ricinus* ha una gamma molto ampia di ospiti; è stato registrato su circa 237 ospiti tra cui molte specie di mammiferi, uccelli e perfino alcuni rettili (lucertole) (Gern, 1994). Tra le circa 30 specie di zecche che si nutrono di esseri umani, *I. ricinus* è la più frequente in Europa (Keirans e Durden, 2005). Nonostante una tale varietà di ospiti, la maggior parte di *I. ricinus* si alimenta su poche specie e le infestazioni da zecche sono spesso limitate a una sola parte della popolazione ospite. Nell' Europa centro-meridionale gli ospiti principali delle forme immature di *I. ricinus* sono roditori, come il topo selvatico dal collo giallo (*Apodemus flavicollis*) e l' arvicola rossastra (*Myodes glareolus*). L'ospite più frequentemente infestato dalle forme ninfali e adulte è il capriolo (*Capreolus capreolus*) a cui è legata la possibilità di dispersione

della zecca (Manilla 1998; Labuda e Nuttall, 2008). La diffusione è inoltre favorita da uccelli e da altri mammiferi che si spostano su ampie aree, mentre il mantenimento è garantito dalla presenza dei piccoli mammiferi. Gli adulti si fissano prevalentemente in zone del corpo a pelo rado (mammelle, inguine e orecchio), ma con il loro lungo rostro si possono attaccare in zone con cute più spessa come il dorso (Maroli e coll., 1996).

*I. ricinus* presenta un'attività maggiore nelle aree del nord dove trova climi più freddi e in genere, in questi habitat, manifesta due picchi di attività: uno in primavera e uno in autunno con durata e variazioni di periodo in funzione della stagione, del tasso di umidità e della temperatura, inoltre questa specie predilige aree boschive con un abbondante sottobosco ad un'altitudine compresa tra i 500-1500 metri anche se è possibile ritrovarla ad altitudini maggiori.

In genere, in un anno, *I. ricinus* si nutre solo una volta compiendo una sola muta, impiegando così almeno 3 anni per completare il suo ciclo di vita. Le zecche che non trovano un ospite nel periodo di attività autunnale passano l'inverno in diapausa tornando nuovamente attive la primavera successiva, quindi il ciclo di vita può anche durare fino a 6 anni. Questo comportamento può fungere da strategia di sopravvivenza a variazioni di clima sfavorevoli (Manilla, 1998; Labuda e Nuttall, 2008).

Nella tabella 2 sono evidenziate le durate di alcune fasi del ciclo biologico di *Ixodes ricinus*.

<i>IXODES RICINUS</i>			
	GIORNI	SETTIMANE	MESI
Periodo di pre-ovodeposizione	7-22		
Durata dell'ovodeposizione	7-30		
Tempo di schiusa		2-36	
Tempo impiegato dalla larva per nutrirsi	2-6		
Tempo impiegato dalla larva per mutare in ninfa		4-51	
Tempo impiegato dalla ninfa per nutrirsi	3-7		
Tempo impiegato dalla ninfa per mutare in adulto		8-28	
Tempo impiegato dalla femmina adulta per nutrirsi	5-14		
Tempo di sopravvivenza della larva senza cibarsi			13-19
Tempo di sopravvivenza della ninfa senza cibarsi			24
Tempo di sopravvivenza dell'adulto senza cibarsi			21-27

Tabella 1.2: Tempistiche del ciclo di *I. ricinus* (Caeiro, 1996)

Questa specie è particolarmente studiata per il suo ruolo di vettore nella trasmissione di *Borrelia burgdorferi* responsabile della malattia di Lyme nell'uomo e della borreliosi negli animali. Risultano particolarmente esposti guardie forestali, cacciatori, boscaioli e naturalisti (Genchi e coll., 2000).

### 1.6.3 DERMACENTOR MARGINATUS

*Dermacentor marginatus* è una specie paleartica ampiamente distribuita in Europa settentrionale e Asia settentrionale e occidentale. Si trova in Germania, Svizzera, Francia meridionale e centrale, Italia e Spagna; inoltre è stata trovata anche in Marocco (Keirans e Durden, 2005).

E' diffusa in quasi tutte le regioni d'Italia (Fig. 12) e nell'area mediterranea. Predilige foreste con faggi, conifere e querce e alle volte si può anche incontrare vicino alle zone abitate. E' una specie trifasica e ditropa, e l'intero ciclo di vita può essere completato in un anno. Gli adulti infestano i ruminanti domestici e gli ungulati selvatici; in Italia centrale è strettamente associata al cinghiale (*Sus scrofa*) (Manilla, 1998). I cani possono essere infestati da soggetti adulti e gli esseri umani sono suscettibili di infestazione da stadi immaturi, anche se gli stadi immaturi sono endofili e si nutrono soprattutto su piccoli mammiferi, come roditori, alcuni carnivori di medie dimensioni e anche su uccelli (Estrada-Peña e coll., 2004).

Spesso però, gli stadi immaturi, si possono ritrovare anche su cani da caccia come in alcuni casi segnalati in Piemonte, Lombardia, Abruzzo e Sicilia (Giangaspero, 1999).

Gli adulti sono attivi in primavera, estate e all'inizio dell'autunno, tuttavia, a causa della grande varietà di condizioni climatiche questa attività è suscettibile di ampie variazioni.

La lunghezza del giorno e le temperature ambientali condizionano la ricerca dell'ospite e di conseguenza l'assunzione del pasto di sangue e infine l'ovodeposizione. Le femmine che cercano gli ospiti nei periodi in cui la durata del giorno aumenta, cioè in primavera e all'inizio dell'estate, riescono a deporre le uova quasi immediatamente. Al contrario, le femmine esposte al declino della durata del giorno prima della ovodeposizione ritardano quest'ultima fino alla primavera successiva (Sonenshine, 2005).

Il ciclo biologico della zecca (Fig. 10) si completa, a seconda dell'andamento climatico e del periodo dell'anno, in 1,5 - 6,5 mesi; questa specie è inoltre considerata un importante vettore di *B. canis* e *B. equi* (Iori e coll., 2005)

*Dermacentor marginatus* è inoltre vettore di *Coxiella burnetii*, *Rickettsia conori*, *R. slovaca*, *R. sibirica*. Inoltre anche *Francisella tularensis* può essere trasmesso da questa specie di zecche (Nosek, 1972; Hillyard, 1996; Raoult e coll., 2002).

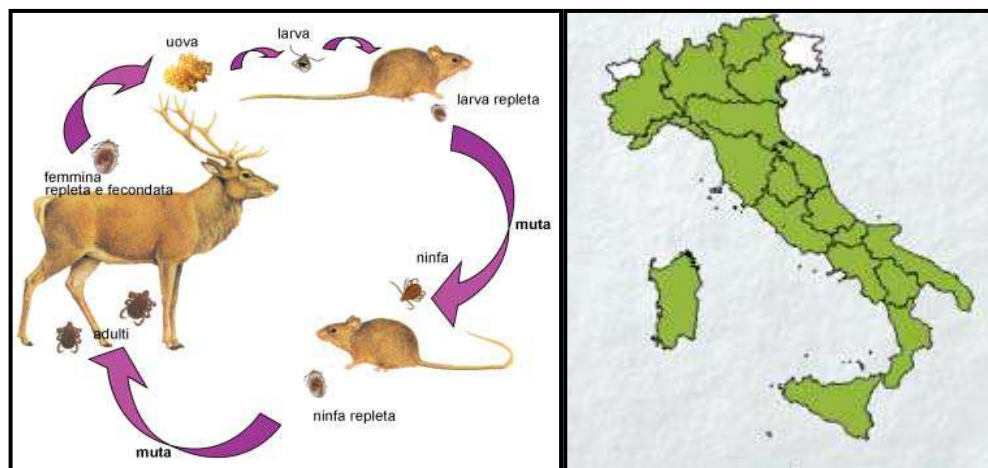


Figura 1.7: Ciclo biologico di *D. marginatus* e distribuzione in Italia (Iori e coll., 2005).



## 1.7 PROFILASSI

Le infestazioni da pulci e zecche sono uno dei principali problemi sia in medicina veterinaria, sia in sanità pubblica, in quanto si possono sviluppare resistenze da parte dei parassiti verso i vari prodotti normalmente utilizzati. E' necessario dunque lo studio e lo sviluppo di nuove molecole, sempre più efficaci e più sicure verso l'animale e verso chi le utilizza. L'importanza del controllo di questi parassiti è punto fondamentale; in Italia il Ministero della Sanità ha emanato due Circolari Ministeriali una datata il 10 Luglio 1995 (C.M. n°19) ed una il 13 Luglio 2000 (C.M. n°10 – malattie trasmesse da zecche – cenni di epidemiologia – misure di prevenzione). Queste circolari hanno posto l'accento oltre che sulle misure di prevenzione anche sui criteri diagnostici delle malattie da zecche. Viene inoltre ribadita la necessità di una corretta notifica al Ministero della Sanità (D.M. 15 dicembre 1990)

### 1.7.1 PRINCIPI GENERALI DELLA LOTTA VERSO LE ZECCH

Le zecche sono parassiti temporanei e la lotta verso di esse deve essere considerata secondo due approcci: durante la loro vita parassitaria sulle specie domestiche e selvatiche e durante la loro fase di vita nell'ambiente.

**Lotta durante la loro vita parassitaria:** un mezzo per contrastare le zecche, in particolare nel cane, consiste nel toglierle manualmente dall'animale dopo ogni uscita; questo metodo è semplice e senza grandi pericoli, ma necessita di una tecnica corretta per non lasciare il rostro della zecca all'interno dei tessuti dell'ospite con possibilità di dare origine ad ascessi. E' possibile utilizzare varie sostanze chimiche antiparassitarie, oggi in commercio con molteplici formulazioni, che messe a contatto con la cute dell'animale hanno effetto preventivo e terapeutico. La somministrazione si effettua attraverso applicazioni regolari, durante la stagione di massima attività delle zecche (Zenner e Gaillot, 2003).

**Lotta nell'ambiente:** in questo caso si agisce sulla zecca durante la sua vita nell'ambiente mediante la distribuzione di acaricidi tramite fumigazioni, aerosol o polveri. Questo metodo tuttavia favorisce l'inquinamento ambientale, la comparsa di chemioresistenza e il pericolo di intossicazione sia per gli animali che per l'uomo, quindi viene utilizzato soprattutto nel caso di zecche endofile che parassitano gli ambienti domestici, la cui eliminazione è spesso difficile. Si stanno studiando metodi alternativi e più ecologici che si propongono di modificare il biotipo della zecca, interferendo con la sua capacità di sopravvivere (Zenner e Gaillot, 2003). Uno di questi metodi si basa sul controllo delle popolazioni di animali selvatici, privando così le zecche immature dei loro ospiti naturali e limitandone la diffusione. Altri metodi fondamentali si applicano sulla vegetazione, falciando l'erba più alta, curando giardini e parchi ed evitando un eccessivo rimboschimento in quanto le aree abbandonate dall'uomo diventano un habitat favorevole al ciclo della zecca (Zenner e Gaillot, 2003).

### 1.7.2 MEZZI MECCANICI, TECNICHE E STRUMENTI

I prodotti antiparassitari in commercio non hanno mai un'efficacia totale e quindi

capita spesso di dover estrarre la zecca manualmente. La rimozione manuale deve portare ad un'estrazione completa del rostro, al fine di evitare complicazioni quali granulomi e infezioni secondarie; in passato si consigliava di utilizzare una pinzetta dopo l'applicazione di etere etilico sulla zecca. Questa tecnica tuttavia si è dimostrata inadeguata in quanto il parassita durante il soffocamento con l'etere rigurgita il pasto di sangue immettendo così nell'ospite eventuali agenti patogeni tramite la saliva, pertanto l'utilizzo di etere, oli e solventi è sconsigliato. Inefficace è l'utilizzo di anestetici locali nel punto di attacco della zecca. Le uniche sostanze da utilizzare sono quindi gli appositi acaricidi. Per estrarre la zecca occorre afferrarla il più vicino possibile al rostro, con una pinzetta o con strumenti specifici, imprimendo una trazione perpendicolare alla superficie cutanea dell'ospite e applicando una rotazione intorno all'asse del corpo della zecca (Zenner e Gaillot, 2003). La rotazione permette di staccare l'apparato buccale dai tessuti dell'ospite, facilitandone l'estrazione, successivamente è utile disinfettare la ferita per minimizzare il rischio d'infezioni secondarie. La specie di appartenenza influisce sull'efficacia dell'estrazione, infatti le zecche con il rostro corto (es. *Rhipicephalus sanguineus*) sono più facili da estrarre rispetto alle zecche con il rostro lungo (es. *Ixodes ricinus*). Nell'uomo l'estrazione della zecca avviene nello stesso modo; è consigliato conservare, per un mese circa, la zecca estratta in un barattolo. Questo perché nel caso si manifestassero dei sintomi clinici correlabili al parassita, il medico può, riconoscendo la specie, risalire all'eventuale patologia trasmessa. In Italia il controllo delle zecche, nei carnivori domestici, è considerato essenziale per la loro capacità di trasmettere agenti patogeni (Manilla, 1998).

### 1.7.3 ACARICIDI USATI NEL CONTROLLO DELLE ZECCHIE

I prodotti acaricidi utilizzati per il controllo delle zecche possono essere formulati come polveri da disciogliere in acqua e distribuire sugli animali attraverso spray o disciolte in vasche da immersione (dipping). Più recentemente i trattamenti possibili comprendono anche prodotti pour-on, iniettabili, boli intraluminali, marche auricolari impregnate o dispositivi contenenti ferormoni e acaricidi applicati in diverse posizioni (George e coll., 2008).

Le vasche di immersione per il controllo di zecche sul bestiame prevedono il passaggio degli animali nella vasca contenente la soluzione acaricida in modo tale da esporre completamente l'animale alla soluzione dalla testa agli zoccoli. Le vasche di immersione devono essere mantenute a livelli di soluzione e di percentuale di principio attivo corretti, soprattutto se utilizzati per più animali e per lunghi periodi di tempo (Latif e Walker, 2004).

Il trattamento può essere ripetuto parecchie volte durante la stagione quando vengono utilizzate soluzioni spray e immersioni. Per raggiungere un'efficacia duratura, gli acaricidi possono essere incorporati in matrici adatte che ne determinano una lenta emissione durante le successive settimane o mesi. I marchi auricolari impregnati di acaricidi vengono ampiamente usati per il controllo delle zecche sul bestiame e su altri grandi animali domestici. Gli acaricidi sistemici forniscono un controllo duraturo ed efficace contro l'infestazione. Queste preparazioni possono essere formulate come prodotti iniettabili, orali e topici, che svolgono la loro azione sul parassita durante la sua attività sulla cute dell'ospite. La

maggior parte degli acaricidi sono troppo tossici da utilizzare regolarmente sugli animali eccezion fatta per i lattoni macrociclici, che sono sistematicamente attivi a dosi molto basse. Ogni metodo di somministrazione presenta i suoi vantaggi e svantaggi. Le corsie spray, ad esempio si mostrano vantaggiose in quanto si utilizza una quantità limitata di acaricida; al passaggio del bestiame uno spruzzo a bassa pressione bagna l'animale con la soluzione acaricida, ma le parti del corpo quali le orecchie e l'inguine non sono efficacemente trattate con questo metodo (Latif e Walker, 2004). Un minor numero di animali può essere trattato con degli atomizzatori portatili. Questi producono uno spray con gocce dal diametro elevato e quindi con effetto bagnante sul pelo dell'animale; questi sono trattamenti economici, ma con un eccessivo spreco di acaricida.

Utilizzando un trattamento selettivo dei siti di attaccamento, preferiti dalla zecca, con spruzzatori manuali l'efficacia sarà parziale e dipendente dall'efficienza del personale che effettua la manualità. Inoltre, con trattamenti parziali di questo tipo, vi è un maggior pericolo di instaurare forti resistenze agli acaricidi (Latif e Walker 2004).

Per quanto riguarda la fauna selvatica, negli ultimi anni, è stato introdotto un concetto importante chiamato controllo "host-targeted", introdotto come metodo di controllo delle zecche senza nuocere ai loro ospiti. Parecchi dispositivi sono stati sviluppati per attirare i cervi o i piccoli mammiferi verso stazioni di alimentazione dove possono venir trattati. Un dispositivo chiamato "four-poster" (baldacchino), viene utilizzato per il controllo delle zecche sui cervi dalla coda bianca (*Odocoileus virginianus*) (Pound e coll., 2000). Il dispositivo è formato da un contenitore centrale contenente l'esca per attirare i cervi e una stazione che eroga l'acaricida ai lati dell'esca. I cervi attirati dalla fonte di cibo inseriscono la testa nel dispositivo e gli erogatori bagnano di soluzione acaricida la pelliccia del cervo. Questi dispositivi presentano come vantaggio il fatto che le applicazioni sono mirate permettendo di utilizzare quantità di antiparassitari nettamente inferiori a quelle utilizzate nelle applicazioni con diffusione ambientale. L'efficacia di questo metodo dipende dalle circostanze ecologiche e dal sito di applicazione. Questi metodi possono essere strumenti importanti nei programmi di controllo del parassita, particolarmente se integrati con altre tecniche di gestione appropriate alle condizioni di distribuzione, dinamica di popolazione e di trasmissione del parassita. In un altro metodo "host-targeted" si utilizzano scatole roditore-target con un esca contenente il fipronil, che si è dimostrato efficace nell'eliminazione degli stadi larvali delle zecche sui topi e quindi nella riduzione della popolazione successiva, ninfe e adulti di *I. scapularis*, riducendo inoltre la percentuale di zecche infettate con *Borrelia burgdorferi*, agente della malattia di Lyme (Dolan e coll., 2004).

Ci sono molte formulazioni acaricide per il trattamento degli animali domestici, gatti e cani, che possono essere trattati con vari prodotti in commercio (fipronil, selamectina, permetrina). I collari impregnati di acaricidi sono disponibili sia per gatti e cani, ma non possono assicurare una totale protezione nei confronti della zecca (Elfassy e coll., 2001; Spencer e coll., 2003).

Il controllo tramite acaricidi pone parecchi problemi in quanto, oltre che a lasciare i residui farmacologici in carne e latte, l'uso di molti acaricidi, come organofosfati e carbammati, è associato a gravi effetti collaterali e a rischi di avvelenamento legati a una dose eccessiva per la specie trattata o per una particolare sensibilità di razza (de Oliveira Monteiro e coll., 2010).

La contaminazione ambientale e gli effetti nocivi sugli animali sono stati ben documentati nel caso degli organoclorati, degli organofosfati, dei carbammati e dei piretroidi (Kunz e Kemp, 1994). Lo sviluppo di resistenze all'acaricida, in alcune specie di zecche, è una situazione preoccupante che continua ad aumentare nelle aree tropicali e subtropicali dove queste specie sono state trovate resistenti agli idrocarburi clorurati, agli insetticidi a base di organo fosfati e ai piretroidi (Kunz e Kemp, 1994).

Quando le zecche sono esposte a sostanze acaricide per un lungo periodo è probabile che si sviluppino, attraverso la selezione naturale, alcuni ceppi mutanti che sono in grado di sopravvivere alla dose normalmente utilizzata. Questi ceppi resistenti possono arrivare ad essere il tipo di zecca predominante in un certo ambiente, riducendo notevolmente l'efficacia dell'acaricida. Questa resistenza può essere elusa utilizzando una sostanza diversa, con il rischio però di produrre nuovi ceppi di zecche resistenti a molti dei composti acaricidi disponibili.

La resistenza agli acaricidi in Europa non è stata ancora riferita, ma per evitare l'inizio di questo fenomeno è necessario seguire alcune regole:

- quando si utilizza un acaricida questo deve essere conservato in modo idoneo e deve venir utilizzato il prima possibile mantenendo così una potenza adeguata come specificato dal produttore;
- tutte le zecche sugli animali trattati dovrebbero venir distrutte o eliminate;
- il tipo dell'acaricida raccomandato dalle autorità veterinarie ufficiali dovrebbe essere usato finché le autorità veterinarie non consiglino di cambiare ad un altro tipo;
- i nuovi acaricidi dovrebbero essere usati preferibilmente soltanto quando i vecchi acaricidi siano diventati inefficaci (Latif e Walker, 2004).

#### 1.7.3.1 Insetticidi-acaricidi derivanti da piante

**Le piretrine naturali:** sono sostanze neurotossiche che sono attive verso una grande varietà di insetti e parassiti e determinano un effetto paralizzante. Queste sostanze sono fotolabili e vengono rapidamente degradate nell'ambiente. I primi piretroidi erano di origine naturale, costosi ed instabili alla luce solare. Le piretrine naturali sono commercializzate in formulazioni spray non particolarmente tossiche per i mammiferi, ma tossiche per i pesci.

**La nicotina:** ha azione sul sistema nervoso ed essendo molto tossica per uomo e animali il suo utilizzo è stato ormai da tempo abbandonato.

**Il rotenone:** originariamente studiato per i pesci, per i quali si è dimostrato con una certa tossicità, venne usato nei mammiferi dimostrando una maggior sicurezza. Oggi è stato sostituito con altri insetticidi più potenti, anche se è possibile trovarlo unito ad altri principi attivi in prodotti utilizzati contro acari delle orecchie e rogna demodettica (Colliot, 1996).

**L'olio di neem:** viene estratto dai semi, spremuti a freddo, di *Azadirachta indica*, un albero che cresce in India e Sud America da sempre utilizzato nella medicina Ayurveda e oggi nella medicina omeopatica. Il suo principio attivo essenziale è la

azadiractina, un composto della famiglia dei limonoidi, che scorre nel sistema linfatico del Neem. Questa sostanza possiede un ampio spettro di effetti inibitori che permettono alla pianta di resistere contro un'enorme quantità di batteri, funghi e insetti.

Una ricerca nel centro-sud Italia, ha testato l'attività repellente nei confronti di ninfe di *I. ricinus*, di due concentrazioni di spray naturale MyggA contenente PMD (para-menthane-3,8-diol) 4.2 e 3.2 g/m<sup>2</sup> e una di RB86 (con il 70% olio di neem contenente azadiractina) 3 g/m<sup>2</sup>. Ogni sostanza è stata applicata separatamente su tele di cotone di 1 metro quadrato e successivamente passato sopra la vegetazione per tragitti di 10 metri.

I risultati hanno evidenziato che tutti i tre trattamenti effettuati hanno mostrato un'attività repellente contro le ninfe di *I. ricinus* (Garbouli e coll., 2006).

#### 1.7.3.2 Insetticidi-acaricidi a base minerale

**Preparati a base di arsenico:** furono impiegati tra il 1850 e il 1950. Inizialmente l'arsenico veniva disciolto in vasche per il dipping; i primi report risalgono agli anni 1895-1896 in Australia e Sud Africa (Angus, 1996; Shaw, 1969). La resistenza sviluppata dalle zecche verso l'arsenico, il limite sottile tra concentrazione efficace e la tossicità per gli animali (DL50 orale tra 1-50 mg/Kg) e la presenza di residui nei tessuti sono stati i principali fattori che hanno determinato la sostituzione di queste sostanze con gli insetticidi sintetici organici dopo la Seconda Guerra Mondiale (Graham e Hourrigan, 1977).

**Derivati a base di fluoro:** non si dimostrarono prodotti utilizzabili per l'elevata dose di somministrazione e la dimostrata tossicità cronica nell'ospite.

**Petrolio e suoi derivati:** furono utilizzati per l'effetto diretto sul parassita, sul quale provocano la morte per asfissia; il loro uso venne però dimesso per gli effetti negativi che causava agli animali domestici. Oggi si possono trovare in commercio in forma di emulsione con altri insetticidi (Colliot, 1996).

#### 1.7.3.3 Insetticidi-acaricidi di sintesi

Furono studiati alla fine del XIX secolo e utilizzati durante la seconda guerra mondiale.

**Derivati del fenolo e del cresolo:** vengono commercializzati come erbicidi e insetticidi, ma i loro componenti non sono molto selettivi e presentano una elevata tossicità per pesci e mammiferi.

**Composti organoclorurati:** scoperti nel 1939, furono usati per molti anni in agricoltura e per il controllo di alcune gravi malattie trasmesse da vettori come la febbre gialla e la malaria. I composti organoclorurati furono i primi insetticidi sintetici e molti di questi furono formulati per il controllo delle zecche sul bestiame. I primi acaricidi furono DDT (*para*-diclorodifeniltricloroetano) e BHC (benzene esaclorato) (Cobbett, 1947; Maunder, 1949; Whitnall e coll., 1951). Il DDT fu il primo insetticida domestico ad avere proprietà neurotossiche specifiche per gli insetti.

Questi composti però sono ora stati ritirati dal mercato (Kunz e Kemp, 1994) , in quanto sono sostanze molto inquinanti e persistenti nell'ambiente e tendono ad accumularsi nel tessuto adiposo (Ware, 2000). In alcuni paesi viene però ancora utilizzato.

Altri composti come il lindano ( $\gamma$ -benzene-esacloridrato) e il metossicloro, sono ancora usati per le applicazioni topiche e sembrano apparentemente sicuri.

Gli organoclorurati colpiscono i nervi sensoriali di insetti e acari inibendo il flusso di potassio nell'assone. Vengono usati come bagni antiparassitari nel cane (DL 30-200 mg/Kg), poiché mostrano un'elevata tossicità nel gatto (DL 30-35 mg/Kg).

Nella maggior parte dei casi d'avvelenamento la causa è il sovradosaggio, evidenziabile con sintomi clinici quali ipereccitabilità, tremori e convulsioni.

In questi casi sarà utile lavare l'animale con acqua e sapone e somministrare del Diazepam (Keck, 1995).

Applicazioni intrauricolari di creme a base di Lindano, possono causare reazioni neurologiche come atassia, nistagmo e convulsioni, dovute all'assorbimento cutaneo della sostanza oppure all'ingestione accidentale del prodotto da parte dell'animale.

**Composti organofosfati - carbammati:** gli organofosfati comprendono un gran numero di composti; agiscono mediante l'inibizione dell'acetilcolinesterasi dell'insetto, determinando il blocco della funzione nervosa. I composti utilizzati per uso topico includono: coumafos, diclorvos, fention, malation e triclorfon. Lo sviluppo di questi composti come antiparassitari era primariamente volto a contrastare la resistenza agli organoclorati da parte delle zecche del genere *Rhipicephalus* (*Boophilus*), molto diffuse negli allevamenti bovini nelle aree tropicali e subtropicali (Shaw, 1970). Ethion, clorpirifos, clorfenvifos e coumafos sono alcuni degli organofosfati più utilizzati per il trattamento di bovini infestati da zecche.

I carbammati furono utilizzati come fungicidi (Dithiocarbammati), erbicidi ed insetticidi; hanno proprietà simili agli organofosfati, essendo inibitori delle colinesterasi (Es. Carbaryl). Questi due composti agiscono sia sui vertebrati che sugli invertebrati; sono disponibili in commercio sia in formulazione spray sia in collari (dichlorvos, diazinon e propoxur). L'impiego dei carbammati nel controllo delle zecche è limitato dalla cross-resistenza delle stesse nei confronti degli organofosfati (Roulston e coll., 1968; Schuntner e coll., 1971; McDougall e Machin, 1988). La resistenza delle zecche nei confronti di queste sostanze colinergiche ne ha limitato ampiamente l'utilizzo in Australia, gran parte dell'Africa e in parte dell'America Latina (Kunz e Kemp, 1994).

L'ingestione accidentale del collare o l'impiego di collari per cani sui gatti possono provocare avvelenamento. La tossicità dipende quindi dall'uso improprio, dalla specie su cui si applica il prodotto, la razza (ad esempio i levrieri sono più sensibili) e l'età: i cuccioli non devono essere, infatti, trattati con questi prodotti. Ci possono essere inoltre interazioni con vari farmaci. L'associazione di antielmintici a base di tetramisolo o levamisolo, determina la comparsa di un'attività colinergica che riproduce gli effetti dell'acetilcolina a livello dei recettori. L'utilizzo di anestetici in animali con collari antiparassitari o trattati con prodotti sistemici, possono dare un effetto di sommazione (si raccomanda la somministrazione preventiva d'atropina per evitare un'eccessiva reazione colinergica). Il trattamento antiparassitario su soggetti da sottoporre a intervento chirurgico deve essere limitato o attuato servendosi di

prodotti che non inibiscono la colinesterasi (Keck, 1995).

I sintomi dati dall'avvelenamento di organofosforati o carbammati sono dati prima da manifestazioni muscariniche: ipersalivazione, aumento delle secrezioni digerenti e respiratorie ed aumento della peristalsi; poi da manifestazioni nicotiniche dovute agli effetti dell'acetilcolina sulle giunzioni neuromuscolari: tremori, fascicolazioni muscolari e paralisi degli arti posteriori. A dosi elevate, infine, possono dare convulsioni. Il trattamento si basa sulla somministrazione di agenti parasimpaticolitici (atropina o il glicopirrolato), o piridil-aldossima (2-Pam, 20 mg/Kg 2 volte al giorno EV).

**Piretroidi sintetici:** sono sostanze con un ampio margine d'azione, utilizzate per uso topico; agiscono sui canali del sodio delle membrane nervose degli insetti e degli acari. Sono spesso utilizzati in combinazione con sostanze sinergizzanti, come il piperonil butossido, che previene l'inattivazione metabolica del piretroide: l'insetto paralizzato può, infatti, riprendersi rapidamente dopo aver eliminato la sostanza (Jones, 2003). Dall'inizio dell'utilizzo di questi composti nel 1949, si riscontrano poi diverse generazioni di piretroidi; i primi utilizzabili nei confronti delle zecche erano quelli di terza generazione, permetrina e fenvalerato (Davey e Ahrens, 1984; Ware, 2000). Cross-reazione col DDT ha poi ridotto l'utilizzo di questi composti in paesi quali l'Australia e il Sud Africa causa la resistenza riscontrata nei confronti di zecche del genere *Boophilus* (ora *Rhipicephalus*) (Nolan e coll, 1979; Coetzee e coll, 1987). Infine Cypermetrina, deltametrina e cialotrina sono esempi di piretroidi di quarta generazione efficaci nella lotta agli acari (Stubbs e coll, 1982; Kunz e Kemp, 1994; Aguirre e coll., 2000). I piretroidi sono abbastanza sicuri per i mammiferi e per volatili, mentre sono molto tossici per i pesci.

L'intossicazione può essere causata da un sovradosaggio o per leccamento. Si manifesta con: eccitabilità, aggressività, tremori, atassia convulsioni, diarrea, vomito e disturbi cardio-respiratori. Possono essere responsabili inoltre di reazioni di ipersensibilità, soprattutto nel gatto, evidenziabili con manifestazioni cutanee come prurito, eritema e ponfi. Si deve intervenire lavando l'animale (se l'intossicazione è avvenuta tramite assorbimento cutaneo), oppure Apomorfina o Xilazina in caso di ingestione (Keck, 1995). I farmaci emetici possono essere usati entro 1-2 ore dall'ingestione per ridurre l'assorbimento gastro-enterico. Si somministrano inoltre purganti e carbone attivo; quest'ultimo può ridurre i sintomi neurologici diminuendo il ricircolo entero-epatico per alcuni di questi tossici (Gfeller e Messonnier, 2004).

**Lattoni macrociclici:** le avermectine (ivermectina, eprinomectina e doramectina) derivano da *Streptomyces avermitilis* mentre le milbemicine, con la milbemicina come unico prodotto efficace nel controllo delle zecche, derivano dai prodotti della fermentazione di *S. hygroscopicus aureolacrimosus* (Lasota e Dybas, 1991). Questi prodotti somministrati per via sottocutanea sono efficaci anche a bassi dosaggi (Gonzales e coll., 1993; Muniz e coll., 1995; Remington e coll., 1997; Caproni e coll., 1998; George e Davey, 2004), inoltre risultati soddisfacenti si sono ottenuti anche con formulazioni puor-on (Davey e George, 2002; George e Davey, 2004). Il costo elevato dei lattoni macrociclici ha però limitato l'impiego di questi nell'allevamento bovino (Kemp e coll, 1999). Hanno elevato effetto acaricida, agiscono sui canali del cloro del parassita e sono attivi nei confronti sia di parassiti esterni, come gli acari, sia verso parassiti interni, come alcuni nematodi.

Esistono diverse formulazioni sia per uso topico che sistemico, con attività ectoparassitocida. Il composto maggiormente utilizzato è l'ivermectina, che può dare fenomeni tossici soprattutto nel collie e suoi incroci (Jones, 2003). L'avvelenamento si manifesta con sintomatologia depressiva, paralisi flaccida e difficoltà respiratoria; non esiste alcun trattamento specifico.

**Amitraz:** è una formamidina esistente in un'unica formulazione usata come ectoparassitocida. E' particolarmente efficace verso zecche e acari, agendo come inibitore della monoamminossidasi e come agonista dei recettori dell'octopamina, che agisce sulle contrazioni della muscolatura del parassita, idrolizzando gruppi aminici dei neurotrasmettitori (Kumar e coll., 2001). Palmer e coll (1971) riportarono i risultati del test dell'utilizzo con successo dell'amitraz nei confronti di *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* sui bovini. Prove successive sia in Australia (Roy-Smith, 1975) che negli Stati Uniti (George e coll., 1998) con formulazioni commerciali confermarono l'efficacia dell'acaricida nei confronti di questa specie di zecche. Altri test effettuati in Sud-Africa dimostrarono l'efficacia dell'amitraz nel controllo di *B. decoloratus*, *R. appendiculatus*, *R. evertsi* and *Amblyomma hebraeum* (Stanford e coll., 1981).

L'amitraz ha un ampio margine di sicurezza ma può essere responsabile di letargia nell'animale, per azione agonista verso gli alfa 2 recettori dei mammiferi; è attivo verso le zecche sia nella forma adulta sia verso uova e larve. L'avvelenamento si manifesta con un rallentamento delle attività digestive e bradicardia. Può essere d'aiuto l'uso di antidoti come Yoimbina e Atipamezolo (Kumar e coll., 2001).

**Fipronil:** deriva da una nuova famiglia di prodotti chimici, i fenilpirazoli, scoperti nel 1981, che non sono correlati a nessun altro insetticida esistente in commercio. Questa sostanza presenta un ampio spettro di azione, insetticida e acaricida, nei confronti dei più importanti parassiti esterni degli animali (Hunter, 1997; Davoust e coll., 2003).

La sua azione si esplica a livello del Sistema Nervoso Centrale, agendo in insetti e acari tramite il legame con i recettori GABA (acido  $\gamma$ -amminobutirrico) dei canali del cloro, con conseguente inibizione del flusso di ioni cloro e interruzione dell'impulso nervoso (Cole e coll., 1993; Moffat, 1993; Tomlin, 1994).

E' somministrato in formulazioni spray o spot-on e mostra un'elevata efficacia e resistenza, con bassa tossicità.

E' considerato molto sicuro nel cane e nel gatto, perché in questi animali non esiste il recettore specifico per il Fipronil (Jeannin, 1996).

Varie ricerche hanno reso evidente delle differenze di sensibilità da parte delle zecche nei confronti di vari parassitocidi; si è visto come la Permetrina sia più efficace del Fipronil verso *I. ricinus* anche se quest'ultimo riesce ad agire su un gran numero di specie di zecche (Endris e coll., 2002; Young e coll., 2003).

Altri studi dimostrano come si abbia un'efficacia maggiore e più durata contro *D. reticulatus* nel cane somministrando combinazioni di fipronil/metoprene rispetto ad un trattamento con imidacloprid/permetrina (Tielemans e coll., 2010).



#### 1.7.4 CONTROLLO FERORMONE ASSISTITO

Il controllo feromone-assistito rappresenta una nuova strategia di controllo delle zecche. La ricerca con i feromoni suggerisce che associando feromoni e acaricidi, si ottengano composti sensibilmente più efficaci, poiché le zecche difficilmente svilupperanno una resistenza verso i propri feromoni. Un dispositivo promettente è costituito da perle (*beads*) di plastica impregnate di un acaricida e da 2,6-diclorofenolo, feromone del sesso, e applicate sul pelo dell'ospite. I maschi delle zecche sono attirati verso le esche nel pelo e sono uccisi. Questo metodo inoltre interrompe l'attività di accoppiamento, in modo che anche le femmine sopravvissute non possano produrre la progenie (Norval e coll., 1996). Recenti ricerche sono state effettuate per l'uccisione delle zecche di *I. scapularis* nei loro habitat naturali impregnando le componenti del feromone di arresto delle zecche (guanina, xantina ed ematina) con la permetrina in una matrice oleosa e disperdendola sulla vegetazione. Queste goccioline pastose hanno attirato e ucciso le zecche prima che queste potessero infestare animali e uomini (Sonenshine e coll., 2003; Sonenshine e coll., 2006; Sonenshine, 2008).

#### 1.7.5 CONTROLLO BIOLOGICO DELLE ZECCHIE

Il controllo biologico delle zecche sembra essere un'alternativa appropriata che può ridurre l'utilizzo di sostanze chimiche nell'esigenza di trattare per ridurre inoltre le malattie trasmesse dalle zecche. Gli agenti biologici di controllo sono ospite-specifici, caratteristica che li rende vantaggiosi per i trattamenti, ma la loro efficacia spesso è relativamente bassa e i costi di fabbricazione sono alti e ci sono seri problemi nell'applicazione.

Numerosi agenti patogeni attaccano le zecche, compresi i batteri, i funghi ed i nematodi (Samish e coll., 2004). I funghi entomopatogeni sono stati utilizzati come agenti di controllo delle zecche (Kaaya, 2000; Samish e Glazer, 2001; Samish e coll., 2004; Polar e coll., 2005). Questi funghi invadono il loro ospite penetrando direttamente dalla cuticola. Dopo la germinazione della spora secernono gli enzimi istolitici e producono un ifa di penetrazione. Dopo la morte dell'ospite, il fungo si sviluppa dal cadavere e sporula (Kleespies, 1993). La facilità con cui le spore di questi funghi possono essere prodotte e diffuse artificialmente rende questi funghi potenziali agenti per il controllo delle zecche (Norval e Horak, 2004). Gli studi sugli effetti del fungo sulle zecche nel terreno sono però scarsi (Benjamin e coll., 2002; Alonso-Díaz e coll., 2007).

È stato riferito che le secrezioni dell'ospite, come il sudore e la temperatura di animali trattati con acaricidi, possono influenzare la virulenza dei funghi entomopatogeni (Polar e coll., 2005). La disseminazione del fungo sulla vegetazione può inoltre colpire gli organismi non target (Hajek e Geottel, 2000; Brownbridge e Glare, 2007) e le quantità richieste nel trattamento di vaste aree sono costose. L'alternativa è rappresentata dall'opportunità di utilizzare un dispositivo di auto-disseminazione per consegnare le zecche agli agenti patogeni (Maniania e coll., 2007). Tali dispositivi usano indicazioni visive, feromoni e kairomones per attirare i parassiti verso una fonte contenente l'agente patogeno (Vega e coll., 2000). Maranga e coll. (2006) hanno provato che si poteva attirare ed infettare sul terreno

*Amblyomma variegatum* con una trappola trattata con il ferormone e contenente il fungo patogeno; le zecche attratte verso la trappola sono state infettate ed uccise dal fungo, con una riduzione numerica della popolazione successiva.

I polli domestici sono predatori opportunisti di zecche e potrebbero essere utilizzati nelle zone rurali in quanto possono nutrirsi di un numero considerevole di zecche soprattutto se possono razzolare tra il bestiame in particolare se questo viene stabulato nelle prime ore del mattino o in tardo pomeriggio (Latif e Walker 2004). Inoltre la coesistenza nello stesso pascolo di uccelli selvatici, come le bufaghe (*Buphagus erythrorhynchus* e *Buphagus africanus*), in Africa, potrebbe essere considerato come metodo di controllo. Questi uccelli, infatti, sono praticamente predatori obbligati di zecche nutrendosi di un gran numero di questi parassiti sia dal bestiame domestico che dalla fauna selvatica.

Anche altri artropodi possono essere utilizzati nel controllo biologico delle zecche: le vespe della superfamiglia Chalcidoidea, del genere *Ixodiphagus* sono parassiti obbligati di zecche Ixodidae e la maggior parte di queste specie si può sviluppare solo nella fase ninfale della zecca, che viene uccisa nel corso di questo processo. Due delle sette specie descritte compiono questo ciclo nei paesi africani (Hu e coll., 1998; Mwangi e coll., 1997; Norval e Horak, 2004).

#### 1.7.6 VACCINAZIONE

In Australia, è stato prodotto un vaccino antigene ricombinante per il controllo del *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, zecca del bestiame, in base ad un cosiddetto antigene celato (Bm86) in cellule dell'intestino della zecca. I rapporti recenti suggeriscono che il Bm86 ricombinante possa ridurre la fecondità del parassita fino al 90%. (Willadsen, 2006; 2008). Sebbene possano comparire fenomeni di resistenza nelle zecche del bestiame, la vaccinazione in ampia scala dei greggi con questi vaccini ricombinanti offre un'alternativa e un supplemento efficace agli acaricidi. Sebbene si usi un antigene ottenuto dal *R. (B.) microplus*, questo risulta ancora più efficace contro il *R. (B.) annulatus* che contro la specie omologa (Fragoso e coll., 1998). Tali effetti non sembrano correlabili con il grado di conservazione della sequenza dell'antigene attraverso queste specie (Willadsen, 2006). Molti antigeni sono stati studiati fino ad oggi, come proteine strutturali, in particolare delle ghiandole salivari, enzimi idrolitici e loro inibitori, in particolare quelli coinvolti nei processi emostatici e una vasta gamma di proteine associate alla membrana con funzione sconosciuta (Willadsen, 2006).

Un altro interessante vaccino mira alla proteina cementante, che serve per l'attacco della zecca, in questo modo verrebbe ostacolato l'attaccamento della zecca, così come la capacità di trasmissione degli agenti patogeni (Labuda e coll., 2006).

#### 1.7.7 AMMINISTRAZIONE DELLA VEGETAZIONE

Il controllo della zecca si effettua soprattutto con il trattamento degli animali. Tuttavia, le modifiche dell'habitat infestato, possono aiutare a ridurre l'abbondanza della zecca in un'area. Molti acaricidi, compreso fosforo organico e piretroidi sintetici, potrebbero applicarsi direttamente sulla vegetazione in giardini, in parchi e nelle aree di picnic. L'utilizzo degli acaricidi fuori dall'ospite nelle aree infestate da

zecche ha un valore limitato perché si presentano comunemente nei micro-ambienti coperti da vegetazione, foglie, terreno e da altri materiali naturali, oppure nidi, tane che non vengono facilmente in contatto diretto con questi tossici. Di conseguenza, per essere efficaci, gli acaricidi devono raggiungere le zecche come vapori o tramite il contatto quando queste si muovono alla ricerca degli ospiti. Tuttavia, il trattamento degli habitat naturali con gli antiparassitari è sconsigliato per i problemi di inquinamento ambientale. Le rotazioni selettive del pascolo riducono spesso l'esposizione del bestiame alle popolazioni di zecche. Tenendo gli animali lontani da determinati pascoli (per esempio rimozione dei cervi con la caccia o con recinti), il numero delle zecche viene ridotto. La bruciatura delle erbe nel pascolo può a volte, ma non sempre, uccidere molte zecche. Per il controllo nelle aree all'aperto, gli sforzi dovrebbero essere fatti, in primo luogo, per rimuovere la vegetazione sovrabbondante che invade queste aree. Inoltre è importante la riduzione di fauna selvatica, roditori, cani randagi e gatti indesiderati, che potrebbero trasportare le zecche in una determinata area. Il controllo dei canili, con pulizia e rimozione della lettiera, è diretto soprattutto contro *R. sanguineus*. Infine, i trattamenti chimici possono essere applicati nelle zone in cui le zecche possono ripararsi quando non si alimentano sull'animale ospite (es. cucce, ricoveri e lettieri) (AA. VV., 2010).

## 1.8 PROTEZIONE PERSONALE DELL'UOMO

Le infestazioni da zecche nell'uomo, possono essere evitate astenendosi dalla frequentazione di campi, foreste ed altri habitat delle zecche dure, particolarmente nelle aree in cui è accertata la presenza di una certa malattia trasmessa da zecche (Ginsberg e Stafford, 2005).

Gli habitat specifici da evitare dipendono dalla distribuzione delle zecche, che può variare in funzione delle specie presenti e degli ospiti su cui possono alimentarsi. Il mantenimento del prato tagliato "all'inglese" nei giardini e nei parchi, applicando barriere di legno, con cartelli segnaletici, per impedire l'accesso ai boschi, può minimizzare l'esposizione umana alle zecche. L'uso di percorsi naturalistici ben definiti può contribuire a evitare il contatto con la vegetazione infestata. La gente in passeggiata dovrebbe indossare: stivali, calzini, pantaloni lunghi e un abbigliamento di colore chiaro. I pantaloni dovrebbero essere inseriti negli stivali e i calzini tirati sopra i pantaloni per proteggere completamente la gamba. L'abbigliamento dovrebbe essere trattato con un repellente o un acaricida. La permetrina è efficace una volta applicata sull'abbigliamento prima di entrare negli habitat infestati. Tuttavia, la permetrina non dovrebbe essere applicata sulla pelle nuda. Ora è possibile trovare, non ancora in Italia, un abbigliamento impregnato in modo permanente con la permetrina, che rimane efficace per tutta la durata dell'indumento, nonostante i ripetuti lavaggi (Vásquez e coll., 2008). Anche la pelle esposta dovrebbe esser trattata con repellenti o con acaricidi adatti all'uso umano. Un repellente molto usato è il toluamide etilico (DEET), disponibile in lozione o spray. Infine è corretto controllare l'intera superficie corporea durante e dopo l'esposizione per evidenziare un'eventuale aggressione e poter rimuovere la zecca tempestivamente. La rimozione immediata è importante per minimizzare il rischio di contrazione delle malattie trasmesse da zecche (Whitehouse, 2004).

## 1.9 RUOLO PATOGENO

L'importanza che le zecche rivestono dal punto di vista economico e sanitario deriva dal fatto che, più di ogni altro gruppo di artropodi ematofagi, sono in grado di nuocere all'ospite non solo direttamente, inducendo ad esempio paralisi o ipersensibilità nell'ospite, ma soprattutto trasmettendo una serie di malattie, ad eziologia diversa, che possono colpire sia gli animali che l'uomo. Si può quindi parlare di patogenicità diretta ed indiretta delle zecche.

### 1.9.1 PATOGENICITA' DIRETTA

Alcune specie di zecche secernono sostanze capaci di causare tossicosi anche letali nei loro ospiti vertebrati. In questi casi, la zecca stessa è l'agente che causa la malattia. Fra queste patologie, la principale è la paralisi da zecca che induce nell'ospite una paralisi motoria provocata dall'introduzione di sostanze tossiche durante il pasto della zecca.

Il morso di zecca può inoltre causare ipersensibilità allergica e tossiemie. Inoltre le infestazioni da zecche hanno effetto anemizzante più o meno grave in funzione del grado di infestazione dell'ospite.

La **paralisi da zecca** è conosciuta in molti paesi appartenenti all'Europa, all'Asia, all'Africa ed al Nord America. La patologia è causata da 46 specie appartenenti alle due principali famiglie di zecche. La maggior parte appartengono agli Ixodidae, ma anche 9 specie di Argasidae sono state identificate come agenti della malattia (Gothe e coll., 1979).

Si conoscono circa quaranta specie di zecche in grado di produrre neurotossine paralizzanti; tra esse ricordiamo: *Ixodes holocyclus* in Australia, *I. ricinus*, *R. evertsi* in Sud Africa, *D. andersoni* nell' America Nord Occidentale e *D. variabilis* in America Nord Orientale (il cane sembra essere il solo animale suscettibile alla tossina di *Dermacentor* spp.).

In molti casi di paralisi causata da zecche Ixodidae si crede che i sintomi siano causati dalle zecche femmine, anche se è stato dimostrato che le ninfe di *Ixodes ricinus* sono in grado di paralizzare conigli in laboratorio (Spickett e coll., 1989). Nella zecca australiana la tossina è stata identificata come una glicoproteina, la holociclotossina, prodotta dalle ghiandole salivari e secreta dalla saliva. Si suppone che anche nelle altre specie la natura della tossina sia la stessa e che venga sempre secreta con la saliva (Sonenshine, 1993). La neurotossina viene prodotta da particolari acini delle ghiandole salivari della zecca (secondo alcuni autori solamente zecche ammalate sono in grado di produrle), che hanno una struttura istologica simile alle ghiandole velenifere dei serpenti (Giangaspero, 1999).

La tossina viene emessa con la saliva durante il pasto della zecca e agirebbe come inibitore del rilascio di acetilcolina a livello pre-sinaptico dei nervi motori, causando una paralisi flaccida ascendente (Shaw e Irwin, 2001).

Per altri autori la tossina si sostituirebbe all'acetilcolina occupandone i recettori. E' stato inoltre osservato, come la secrezione della neurotossina avvenga spesso in concomitanza all'ovogenesi (Adelus, 1995).

La paralisi da zecca è più comune nel bestiame e negli animali da compagnia, ma anche i gallinacei domestici ed anche alcuni animali selvatici vengono colpiti. Alcuni casi si verificano anche nell'uomo e possono portare alla morte se la zecca non viene rimossa. L'evoluzione della malattia è rapida così come la sua risoluzione, poiché è sufficiente allontanare i parassiti per avere una rapida guarigione dell'animale che infatti, pochi minuti dopo il distacco delle zecche, riprende la stazione quadrupedale. Nel caso però s'intervenga tardivamente la patologia è irreversibile e la prognosi è infausta. I segni clinici sono rappresentati da: disfonia, disfagia (dovuti al coinvolgimento dei nervi cranici), paralisi all'estremità inferiore degli arti anteriori che prosegue fino ai muscoli respiratori provocando la morte. In Italia fino ad ora non sono stati resi noti casi di paralisi da zecche sul cane (Giangaspero, 1999), né su altri animali.

Anche nell'uomo la paralisi da zecca inizia generalmente nelle estremità inferiori e ascende simmetricamente fino a coinvolgere il tronco, gli arti superiori e la testa in poche ore (Engin e coll., 2006). La paralisi da zecca colpisce principalmente giovani donne nelle regioni endemiche. Una serie di casi recenti hanno visto un aumento della frequenza dovuta in realtà a un aumento di diagnosi errate come la sindrome di Guillain-Barré. Un'analisi della letteratura scientifica, condotta da Diaz (2010) utilizzando motori di ricerca in internet per valutare l'evoluzione e l'epidemiologia

della paralisi da zecca, prende in considerazione cinquanta casi umani ben documentati tra il 1946-2006. I casi sono stati stratificati in base ai dati demografici, le manifestazioni cliniche e gli esiti. La paralisi da zecca si è verificata stagionalmente e in modo sporadico nei singoli soggetti e in gruppi di bambini e adulti di entrambi i sessi, in luoghi urbani e rurali. La paralisi da zecca dovrebbe essere aggiunta e rapidamente esclusa dalla diagnosi differenziali di atassia acuta e paralisi flaccida, soprattutto nei bambini che vivono in regioni endemiche degli Stati Uniti.

Da molti anni sono note **tossicosi da zecca** diverse dalla paralisi. Le più comuni sono state associate al morso di zecche Argasidae. In Africa il morso di *Ornithodoros savignyi* causa la morte del bestiame in meno di un giorno. Gravi tossicosi, nello stesso continente, si possono verificare nell'uomo in seguito al morso di *Argas brumpti* e *Ornithodoros moubata*. In Messico e negli USA occidentali l'agente principale di tossicosi da zecca è *Ornithodoros coriaceus* e un altro Argasidae (*Ornithodoros lahorensis*) è stato individuato come causa di tossicosi nelle pecore nell'est dell'Europa. I sintomi includono tremori, saliva schiumosa, digrignamento dei denti e, a volte, paralisi (Gregson, 1973). In Africa, inoltre, *Hyalomma truncatum* è responsabile della cosiddetta "sweating sickness", una tossicosi che colpisce bovini, pecore, capre, maiali e anche i cani. L'agente eziologico è una tossina secreta dalle femmine di *H. truncatum* durante il pasto di sangue (Spickett, 1992). La patologia è diffusa nell'Africa centrale, orientale e meridionale ed è stata evidenziata anche in India e Sri-Lanka, benché qui non sia presente la specie di zecca ritenuta responsabile della malattia (Burger e coll., 1991). Questa tossicosi è caratterizzata da febbre, anoressia, iperestesia della pelle e delle membrane mucose, salivazione profusa ed eczema ma non c'è paralisi. La mortalità è comunque del 75%.

Il morso di zecca può causare inoltre una grave reazione allergica che si esprime con un'immediata **reazione di ipersensibilità** IgE-mediata verso gli allergeni della zecca (Gauci e coll., 1989). La zecca per nutrirsi deve superare tre elementi del sistema difensivo dell'ospite: emostasi, risposta infiammatoria e risposta cellulomediata. Dopo la sua salita sull'ospite, la zecca deve scegliere la zona cui attaccarsi, poi taglia la cute con i cheliceri, penetra con l'ipostoma e traumatizzando i tessuti dell'animale stimola, in esso, una risposta infiammatoria (Merchant e Ttaboada, 1991).

L'infiammazione viene determinata, oltre che dall'azione meccanica già descritta, anche dall'azione irritante della saliva del vettore che induce l'attivazione piastrinica, la liberazione d'istamina e serotonina, che insieme alla bradichinina, prodotta in risposta al danno cellulare, determinano vasodilatazione, aumento della permeabilità vasale e dolore (Sonenshine, 1994).

Per contrastare alcuni di questi effetti, la zecca, tramite la saliva, introduce delle sostanze anticoagulanti, prostaglandine (PGE), prostacicline e sostanze antistaminiche, con la funzione di inibitori dell'aggregazione piastrinica, vasodilatatori e antagonisti dell'emostasi.

Contemporaneamente, per poter rimanere attaccata all'ospite, la zecca utilizza degli specifici composti che inattivano i mediatori chimici responsabili dei processi infiammatori rivelatori della presenza del parassita sull'ospite; altri composti secreti

consentono di rafforzare il flusso di sangue durante il pasto (Sonenshine, 1994). Ad esempio è stato trovato nella saliva di *I. scapularis*, un inibitore della bradichinina, il dipeptidilcarbossilpeptidasi (Wikel, 1999).

Per quanto riguarda gli altri due elementi del sistema difensivo dell'ospite, occorre considerare che l'attacco della zecca stimola in quest'ultimo una serie di reazioni consequenziali attivate dalla penetrazione della zecca nella pelle: infatti questa secerne sostanze con caratteristiche antigeniche che provocano, a livello dei tessuti dell'ospite, un rilascio di mediatori chimici che stimolano l'infiammazione e richiamano cellule infiammatorie, provocando inoltre la degranulazione dei mastociti con liberazione di istamina. Gli antigeni secreti dalla zecca vengono catturati dalle cellule di Langerhans che li presentano ai linfociti T; quest'ultimi rilasciano citochine che determinano la secrezione da parte dei Linfociti B di specifiche IgM, IgG e IgE (Loi, 2001).

Inoltre gli enzimi salivari attivano le frazioni del complemento C3 e C5, con conseguente produzione di anafilotossine, che hanno una potente azione chemiotattica per i leucociti (Capelli e coll., 1996). In seguito a queste risposte, nell'ospite si può instaurare una resistenza, che si evidenzia sulla zecca come una minor capacità di ingorgarsi, minor produzione di uova, incapacità nell'accoppiamento fino alla morte. Dopo lunghi periodi di ripetuti attacchi da parte delle zecche si possono formare anche degli immunocomplessi (Capelli e coll., 1996). L'immunità, data dall'interazione dell'ospite con gli artropodi, è una delle reazioni più studiate (Wikel, 1999). Nel cane infestato con *R. sanguineus* tutto questo non avviene, perché la zecca non induce una risposta immunitaria nell'ospite (Szabò e Bechara, 1995; Willandsen, 1980). Per questo motivo il cane si può reinfestare più volte permettendo una circolazione continua dell'agente patogeno eventualmente trasmesso. E' importante, tuttavia, distinguere il tipo di reazione dopo un primo attacco da parte delle zecche da quella che si ha in seguito a più attacchi. Nel caso di una seconda aggressione infatti la risposta infiammatoria, può essere totalmente soppressa o addirittura distrutta.

La ferita determinata dalla zecca può peggiorare nel caso di complicazioni batteriche (es. *Staphylococcus spp.*) o di contaminazione da parte di larve di mosca. Si possono così sviluppare forme ascessuali, anche se questo processo avviene più frequentemente nel caso in cui il rostro della zecca rimanga all'interno del tessuto dell'ospite durante il tentativo di rimozione (Giangaspero, 1999).

Un altro aspetto importante da tenere in considerazione durante l'infestazione da zecche, sono gli effetti dei fattori immunodepressori indotti dal pasto delle zecche sull'ospite. Vari studi hanno dimostrato che, durante l'infestazione, si ha un decremento della risposta immunitaria T-dipendente con una diminuzione dei T-helper 1 e un aumento T-helper 2 e dell'interleuchina 10. Non sempre quindi si viene a creare una risposta protettiva verso il parassita (Wikel, 1999), ad esempio dalle ghiandole salivari di *D. reticulatus* si è ottenuto un composto in grado di ridurre le cellule Natural Killer in vitro; quest'ultime sono importanti nella produzione di citochine,  $\gamma$ -interferone e nella produzione di Th1 (Th2 non subisce nessuna diminuzione) (Wikel, 1999).

La complessa interazione tra ospite e parassita aumenta se quest'ultimo è vettore di agenti patogeni; infatti, la zecca è in grado di modulare la risposta immunitaria dell'ospite regolando l'andamento dell'infestazione stessa e nel caso di trasmissione di un agente infettante ne può favorire la sopravvivenza.

La modulazione dell'immunità da parte della zecca, che favorisce l'infezione di agenti patogeni da essa trasmessi, viene attuata grazie a:

- alterazione funzionale delle cellule presentanti l'antigene;
- diminuzione dei linfociti T;
- soppressione o alterazione della produzione di citochine;
- diminuzione della risposta anticorpale;
- inibizione del complemento (Willadsen e Jongejan, 1999).

In Europa sono stati segnalati casi di allergia in relazione al morso di *Argas reflexus*, parassita del piccione. Nuttall e coll. già nel 1908 avevano descritto gravi reazioni al morso di questa zecca molle che occasionalmente attacca l'uomo. I sintomi comprendono nausea, vomito, diarrea, edema, eritema e pulsazioni irregolari. Occasionalmente le reazioni sono state tanto gravi da portare alla perdita di conoscenza (Harwood e James, 1979).

L'**azione anemizzante**, infine, è legata alla sottrazione di sangue da parte di un numero elevato di zecche localizzate su un singolo animale.

Ogni zecca è in grado di aumentare fino al 100 volte il proprio peso corporeo; questo dipende dallo stadio di sviluppo del parassita e dalla specie a cui appartiene. Per esempio, le specie appartenenti al genere *Amblyomma* sono quelle dotate della maggior capacità di sottrarre sangue provocando vari gradi di anemia (Manilla, 1998).

Ogni anno in estate, durante il periodo di massima attività delle zecche, sono riportati casi di anemia soprattutto in cani, la cui gravità dipende dal grado di parassitosi e dalla quantità del sangue sottratto. Nei cani se l'ematocrito raggiunge l'11% si è di fronte ad un caso molto grave, che necessita di trasfusione immediata (Sodikoff, 1997). La rapidità d'intervento è essenziale; bisognerà eliminare tutti i parassiti ed intervenire con terapie di supporto.

### 1.9.2 PATOGENICITA' INDIRETTA

Diversi tipi di microrganismi, tra cui protozoi, batteri e virus, vengono veicolati e trasmessi all'uomo e agli animali dalle zecche (Tab. 3). Le zecche sono spesso vettori biologici di agenti patogeni e possono garantirne la persistenza nell'ambiente tramite la trasmissione transovarica (l'infezione si trasmette attraverso le uova dalla madre alla prole) transtadiale (da larva a ninfe e / o da ninfe ad adulto), per co-feeding (zecca che effettua il pasto di sangue accanto ad un'altra infetta) e per via orizzontale tra animali positivi (Maioli e coll., 2009).



Malattia	Agente Eziologico	Vettore principale	Reservoir(s)	Distribuzione Geografica
<b>TBE</b> (Central European Encephalitis; Russian spring summer encephalitis)	<i>Flavivirus</i>	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>Ixodes persulcatus</i>	Roditori, insettivori	Europa, Russia, Siberia
<b>Powassan</b>	<i>Flavivirus</i>	<i>Ixodes</i> , <i>Dermacentor</i> ; <i>Haemaphysalis</i>	Roditori, mustelidi, lagomorfi	Canada, USA, Russia
<b>Kysanur forest disease</b>	<i>Flavivirus</i>	<i>Haemaphysalis spinigera</i>	Scimmie, micromammiferi	India
<b>Colorado tick fever</b>	<i>Coltivirus</i>	<i>Dermacentor andersoni</i>	Roditori	Nord America, Canada
<b>CCHF</b> (Crimean-Congo Hemorrhagic Fever)	<i>Nairovirus</i>	<i>Hyalomma</i>	Lepre, riccio, micromammiferi	Africa sub sahariana, Balcani, Turchia, Grecia, Sudest Asiatico
<b>Rocky Mountain Spotted Fever</b>	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Dermacentor variabilis</i> , <i>Dermacentor andersoni</i>	Roditori, lagomorfi	Nord America
<b>Febbre Bottonosa del Mediterraneo</b>	<i>Rickettsia conorii</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Roditori, riccio	Bacino del Mediterraneo, Africa Sub sahariana, Medio Oriente
<b>Altre rickettsiosi</b>	<i>R. slovaca</i> <i>R. sibirica</i> <i>R. helvetica</i> <i>R. africae</i>	<i>Dermacentor</i> <i>Haemaphysalis</i> <i>Ixodes</i> <i>Amblyomma</i>	Micromammiferi, Roditori	Europa Africa
<b>Anaplasmosi umana (HGA)</b>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. scapularis</i> , <i>I. pacificus</i>	Roditori	Europa, USA
<b>Ehrlichiosi (Human Monocytotropic Ehrlichiosis)</b>	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	<i>Amblyomma americanum</i> , <i>Dermacentor variabilis</i>	Cervidi, cane	Europa, USA
<b>Febbre Q</b>	<i>Coxiella burnetii</i>	Più di 40 specie	Ruminanti	Cosmopolita
<b>Malattia di Lyme</b>	<i>Borrelia Burgdoferi</i> s.l.	<i>Ixodes</i>	Roditori, Uccelli	Regioni temperate dell'emisfero nord
<b>Tularemia</b>	<i>Francisella tularensis</i>	Più di 20 specie	Lagomorfi	Regioni temperate dell'emisfero nord
<b>Babesiosi</b>	<i>Babesia microti</i> <i>Babesia divergens</i> <i>B. venatorum</i> (EU1)	<i>Ixodes scapularis</i> <i>Ixodes ricinus</i>	Roditori Bovini Cervidi	USA Europa

Tabella 1.3: Principali zoonosi trasmesse da zecche (Maioli e coll., 2009)

Le malattie trasmesse da zecche sono di solito distribuite geograficamente all'interno delle aree in cui sono diffusi i loro serbatoi; possono causare sia gravi segni clinici, in fase acuta, sia forme sub-cliniche, soprattutto nelle zone endemiche. Inoltre, possono verificarsi co-infezioni con diversi patogeni nello stesso animale vertebrato, situazione che deriva dal fatto che la stessa specie di zecca può trasmettere diversi patogeni (ad esempio *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* da *Rhipicephalus sanguineus*). Queste co-infezioni sono frequenti negli animali da compagnia che vivono in aree endemiche e spesso possono compromettere una corretta diagnosi eziologica (AA.VV., 2007).

La trasmissione di agenti patogeni avviene principalmente con la saliva delle zecche durante la fase di alimentazione, soprattutto nella fase rapida, verso la fine, con il rigurgito; nella zecca adulta durante la fase di alimentazione lenta la trasmissione è limitata perché non c'è secrezione salivare (Giangaspero, 1999). Gli agenti patogeni assunti dalla zecca, che si è alimentata su un organismo infetto, si distribuiscono in vari organi e tessuti del parassita ed infine si vanno a localizzare nelle ghiandole salivari. La capacità di trasmettere l'infezione all'ospite dipende dalla capacità della zecca di trattenere e trasmettere l'agente patogeno e dal numero d'unità infettanti necessarie allo sviluppo della malattia. Durante la suzione l'agente infettante viene trasmesso all'ospite dopo un certo periodo di tempo; nel caso delle Rickettsie occorrono 10 ore, per *Borellia* 2-3 giorni, mentre per *Babesia* sono necessarie 48 ore. Una rapida rimozione della zecca può quindi prevenire la trasmissione del patogeno (Adelus, 1995). Le zecche spesso hanno, oltre al ruolo di vettore d'agenti patogeni, anche quello di serbatoio di tali microrganismi, garantendone così la sopravvivenza nel tempo in un ambiente, grazie alla trasmissione transovarica e transtadiale (Manilla, 1998) di cui si è già accennato. Di particolare rilevanza è quest'ultimo metodo che è una caratteristica tipica delle zecche dure e non si ritrova in altri artropodi ematofagi, poiché il metabolismo degli Ixodidae è caratterizzato da scarsi processi istolitici durante la muta (Manilla, 1998). Questi metodi di trasmissione sono molto importanti per aumentare il numero di ospiti infetti, grazie anche alla bassa specificità di alcune zecche. Risulta dunque chiara l'importanza del controllo di questi artropodi che rivestono quindi un ruolo notevole sia dal punto di vista sanitario che economico. Tali parassiti, infatti, sono dei fattori limitanti nella produzione animale poiché determinano un calo nella produzione e perdite di capi di bestiame; sono inoltre causa di disturbo per l'uomo. La zecca può trasmettere un'infezione oltre che attivamente, grazie al morso, anche passivamente in seguito all'ingestione della zecca stessa (*Hepatozoon canis*), per l'ingestione di alimenti provenienti da animali infestati di zecche infette (es. latte crudo per l'uomo) o per inalazioni di polveri contenenti il patogeno, eliminato con le feci di Ixodidae (*Coxiella burnetti*) (Manilla, 1998).

#### Ecologia della diffusione dei patogeni trasmessi da zecche

Lo studio delle relazioni esistenti tra vettori, agenti patogeni ed ospiti è importante per comprendere come il patogeno persista nell'ambiente e come sia possibile la sua diffusione, predire l'evoluzione della malattia, effettuare piani di controllo e prevenzione. Le zecche si comportano sia da vettori biologici all'interno dei quali l'agente patogeno attua una parte del suo ciclo, sia da vettori meccanici che veicolano da un animale all'altro gli agenti patogeni. Ci sono molte malattie, la cui diffusione è legata alle zecche che possono essere considerate emergenti o

riemergenti in seguito a variazioni climatiche e cambiamenti d'uso del territorio.

Infatti i cambiamenti d'uso del territorio sia in USA che in Europa hanno favorito l'aumento di zecche come ad esempio *Ixodes scapularis* e *I. ricinus* rispettivamente. Il ripristino di vaste aree agricole a foreste nel ventesimo secolo ha determinato un incremento di cervidi, roditori e uccelli con conseguente aumento delle zecche. Secondo studi condotti in Massachusetts le popolazioni di cervidi dovrebbero essere eliminate per ridurre la presenza di zecche nell'ambiente (Wilson e coll., 1988). Anche l'incremento dei roditori, principale serbatoio di agenti zoonosici quali *Borrelia burgdorferi* o *Babesia microti*, è un altro fattore importante per il mantenimento delle zecche vettrici nell'ambiente (Magnarelli, 2011).

Il mantenimento del patogeno è dato dalla possibilità di scambio tra ospite infetto - zecca non infetta e tra zecca infetta - ospite sano (Genchi, 1996).

Ospite infetto - zecca non infetta: in questo caso maggiore sarà il numero d'animali infetti maggiore sarà anche il numero di zecche che assumeranno l'agente patogeno. L'ospite vertebrato rappresenta dunque, un *reservoir* ovvero un serbatoio di infezione. Maggiore sarà il numero di specie su cui la zecca si nutre maggiore sarà la probabilità che si infetti (Mather e Ginsberg, 1994).

L'infettività di una specie è rappresentata dal numero di zecche che diventano infette dopo il pasto di sangue su una determinata specie. Le specie che fungono da ospiti per le zecche si dividono in riproduttivi e *reservoirs*. I primi hanno un ruolo importante nel fornire il pasto di sangue alle zecche, ma non trasmettono infezioni, gli altri servono a mantenere l'infezione nell'ambiente e a mantenere infette le popolazioni di zecche (Genchi e coll., 2000).

Il tasso d'infestazione del *reservoir* è un altro parametro importante. Il numero di infezioni dell'ospite è dato dal numero di zecche infette e dal livello di infestazione delle stesse. Da tenere presente è il turn-over della popolazione degli ospiti; molti animali infatti, dopo un certo periodo di tempo diventano immuni verso la malattia o possono perdere l'infettività. Per la diffusione dell'agente eziologico c'è dunque bisogno di altri ospiti recettivi. La durata dell'infettività dell'ospite condiziona il mantenimento e l'amplificazione della malattia ed è variabile secondo il patogeno considerato: può essere di alcune settimane (*Babesia* spp.) o tutta la vita (*Hepatozoon* spp.) (Genchi e coll., 2000). Non sempre la maggiore infettività dell'ospite assicura una maggiore infettività della zecca; infatti, un'elevata quantità di patogeni ingeriti da essa, si accompagna ad una ridotta trasmissione transovarica per l'aumento delle mortalità delle uova (Mather e Ginsberg, 1994). La probabilità d'infezione dell'ospite dipende inoltre dal suo comportamento in natura, questo influisce sulla possibilità di entrare in contatto con zecche infette. Un animale che vive in zone popolate da zecche sarà a maggior rischio di infettarsi. Nel caso della babesiosi canina, i cani da caccia risultano più esposti che altri, proprio per la loro possibilità di venire in contatto con zecche infette durante le battute di caccia tra i boschi e per la probabilità di incontrare zecche infette durante gli spostamenti all'estero in zone endemiche. Al loro ritorno i cani potrebbero importare zecche infette e diffondere agenti patogeni, infettando anche le zecche del nostro territorio. Nel primo caso, se le zecche trovano fattori microclimatici e ambientali adeguati, si riproducono amplificano la malattia grazie anche alla già detta trasmissione transovarica e transtadiale (Genchi e coll., 2000).

Zecca infetta - ospite sano: la trasmissione dell'agente patogeno non avviene per tutte le punture di zecca poiché non tutte le punture sono in grado di trasmettere un

numero adeguato di agenti patogeni utili per sviluppare la malattia. La prevalenza di infezione delle zecche è un parametro importante da valutare e dipende sia dal numero di zecche infette che dal numero di ospiti disponibili. In questo modo si può calcolare la probabilità che un ospite si infetti (Genchi e coll., 2000).

In questa tesi saranno prese in considerazione le seguenti malattie trasmesse da zecche: piroplasmosi, borreliosi di Lyme e anaplasmosi da *Anaplasma phagocytophilum*.

# 2

# PIROPLASMOSI

## 2.1 CENNI STORICI

Fra le piroplasmosi, indubbiamente le infezioni causate da parassiti appartenenti al genere *Babesia* spp. (Babesiosi) sono fra le più conosciute.

La prima documentazione “storica” di un’infezione da *Babesia* è contenuta nel libro biblico dell’Esodo, in cui la piaga dei bovini egiziani è descritta come una “grave epizoozia” che può essere ricondotta alla febbre dell’acqua rossa dei bovini (causata da *B. bovis*) che ha come sintomo principale l’ematuria (Homer e coll., 2000).

Si capisce così come le infezioni da *Babesia* spp. abbiano complicato la vita dell’uomo fin dall’antichità, primariamente attraverso le infezioni degli animali domestici, mentre solo nella seconda metà di questo secolo, quest’infezione è diventata un rischio per la salute dell’uomo, diventando una malattia zoonotica emergente.

Molti studi riferiti alla babesiosi in campo animale, sono stati rivolti indubbiamente ai bovini; l’esistenza di questo parassita non è stata formalmente riconosciuta fino al 1888, con il lavoro di Viktor Babes, studioso ungherese, che studiò la causa dell’emoglobinuria con febbre nei bovini. Il nome *Babesia* venne, infatti, dato in suo onore, poiché per primo osservò un “batterio” intraeritrocitario Gram-positivo ritenuto responsabile di aver infettato circa 50.000 bovini in Romania nel tardo diciannovesimo secolo (Babes, 1888). Babes usò il termine *Haematococcus*, mentre *Babesia* fu coniato da Starcovici nel 1893.

Nello stesso periodo Daniel Elmer Salmon (1885), il fondatore dei servizi veterinari del governo degli USA, dimostrò che nessuno dei meccanismi di trasmissione delle malattie conosciuti fino a quel momento riusciva a spiegare l’andamento della febbre del Texas nella popolazione bovina degli USA, e che la malattia non era riscontrabile nei bovini al nord di una linea da lui determinata. Frederick Kilborne, un veterinario americano (Schwabe e coll., 1986), credeva che l’habitat delle zecche del bovino, coincidesse con i limiti territoriali indicati da Salmon per la febbre del Texas, e tentò di verificare tale ipotesi. Le varie sperimentazioni, ripetute nelle estati del 1890, 1891 e 1892, portarono alla conclusione che solo i bovini recettivi (del Nord), esposti alla contaminazione da zecche, si ammalavano. Il risultato finale di tutti gli esperimenti di Kilborne fu di stabilire in modo certo, prima ancora di scoprire l’agente eziologico della malattia, che la zecca era un fattore importante della febbre del Texas e che la malattia non si verificava in sua assenza; inoltre la progenie di tale zecca, poteva anch’essa causare la malattia. La messa in evidenza della relazione intercorrente fra parassita-ospite invertebrato-ospite vertebrato fu una delle maggiori scoperte fatte nella storia della scienza medica (Schwabe e coll., 1986). Contemporaneamente a Kilborne, Theobald Smith, un giovane medico del Bureau of Animal Industry (B.A.I.), dimostrò che l’agente eziologico responsabile della febbre del Texas era un protozoo del sangue inizialmente chiamato *Pyrosoma*, e successivamente identificato come *B. bigemina* (Schwabe e coll., 1986).

Studiando la malattia dei bovini in Argentina, Lignieres riconobbe nel 1903 che stava lavorando con due ceppi di *Babesia bigemina*. Una forma era grande, simile all’organismo descritto da Smith e Kilborne, mentre l’altra era piccola e spesso difficile da trovare nello striscio di sangue, ma più facilmente visibile nei capillari dei

reni e nelle meningi del sistema nervoso centrale (Lignieres, 1903). Lignieres, nel 1910 nominò tale piccolo organismo *Piroplasma argentina*, successivamente conosciuto come *Babesia argentina*. Il termine *B. argentina* fu utilizzato per molti anni in Australia, nell'America del Sud e Centrale e nel 1970, i parassitologi concordarono che *B. argentina* era sinonimo *B. bovis* (Brocklesby e coll., 1976).

M'Fadyean e Stockman nel 1911, riconobbero un piccolo organismo intraeritrocitario in bovini in Inghilterra, che chiamarono *Piroplasma divergens* (poi *Babesia divergens*) (M'Fadyean e Stockman, 1911). Ricercatori europei osservarono organismi simili che indicarono come *B. bovis* e per molti anni si pensò che *B. divergens* fosse sinonimo di *B. bovis*. Sergent e coll. nel 1926 riscontrarono una grande babesia che sembrava differente da *B. bigemina* e che chiamarono *B. major* (Sergent e coll., 1926). Rees nel 1934 determinò che sia *Babesia bigemina* che *Babesia bovis* erano presenti in USA ed erano coinvolte nella febbre del Texas.

I ricercatori jugoslavi Simic, Petrovic e Rakovic nel 1955 riconobbero che le zecche, che trasmettono il parassita, sono legate alla specie di *Babesia* (Simic e coll., 1955). *B. bigemina* e *B. bovis* sono trasmesse da zecche del genere *Boophilus*, che richiedono un clima relativamente caldo per completare il loro sviluppo; infatti non sono presenti nel nord Europa. Al contrario, *Ixodes ricinus* e *Haemaphysalis punctata*, che generalmente sono presenti nel nord e nell'ovest dell'Europa, sono vettori adatti per *B. divergens* e *B. major*. La somiglianza morfologica tra *B. major* e *B. bigemina* era tale che solo nel 1968 Zwart e coll. confermarono la differenza fra le due. *B. major*, presente in Gran Bretagna e nel nord Europa, ha una moderata patogenicità e forse proprio per questa ragione è stata anche in passato sottostimata (Brocklesby e Barnett, 1970).

Brocklesby nel 1976 indicò l'esistenza di quattro specie di babesie nei bovini: *B. bigemina*, *B. major*, *B. bovis* e *B. divergens*, confermate attraverso studi sierologici (Leefflang e Perie., 1972; Goldman e Rosenberg., 1974). Ulteriori tre specie di babesie bovine: *B. ovata*, *B. jakimovi* e *B. occultans*, sono state successivamente identificate e descritte attraverso varie tecniche sierologiche (Minami e coll., 1979; Purnell, 1981; Gray e Potgieter, 1981). *B. ovata* fu identificata nel 1980 da Minami e Ishihara in Giappone, trasmessa per via transovarica da *H. longicornis*. Nel 1981 fu osservata una babesia simile in Sud-Africa nominata *B. occultans*, trasmessa per via transovarica da *Hyalomma marginatum rufipes*. *B. jakimovi* a differenza di *B. ovata* e *B. occultans* è patogena per i bovini ed è l'agente eziologico della piroplasmosi in Siberia. Oltre ai bovini *B. jakimovi* può infettare anche i caprioli (*Capreolus capreolus*), l'alce (*Alces alces*) e la renna (*Rangifer tarandus*). *B. odocoilei* (*B. cervi*), dei cervi della Virginia, morfologicamente simile a *B. divergens*, è stata identificata e descritta in Texas e Virginia (Emerson e Wright, 1968; Perry e coll., 1985).

Oltre agli studi sul bovino, il genere *Babesia* fu studiato inoltre nel sangue di altri animali quali cavallo, gatto, cane, suino, oltre che nell'uomo.

Nel cavallo un emoparassita intraeritrocitario simile a *B. bigemina* fu osservato per la prima volta da Guglielmi nel 1899 (Henning, 1956). Theiler nel 1901 e 1902 descrisse per la prima volta la babesiosi equina ed insieme a Laveran nel 1901 conferirono il nome "equi" a questa piccola babesia (Theiler, 1906; Laveran, 1901). *B. equi* è stata osservata per la prima volta nella zebra da Theiler nel 1905 (Theiler, 1905; Theiler, 1906) e fu verificata la sua possibilità di trasmissione dalla zebra al cavallo tramite inoculazioni di sangue (Dennig, 1966).

Nel 1929 fu identificata per la prima volta *B. felis*, riscontrata in un gatto selvatico sudanese, ma segnalata come patogena anche nei gatti domestici (Davis, 1929).

La babesiosi canina fu inizialmente riportata nel 1934 in Florida (Eaton, 1934). In passato si pensava che gli agenti eziologici potessero essere distinti in due specie: *B. canis* (una babesia di grandi dimensioni) e *B. gibsoni* (una 'piccola' babesia); *B. canis* sembrava distribuita un po' in tutto il mondo, mentre *Babesia gibsoni* si pensava fosse presente solo in Africa, India, Sri Lanka e Malesia (Groves e Vanniasingham., 1970); più recentemente questo parassita è stato segnalato anche in Europa, USA, Korea e Okinawa (Dennig e coll., 1980; Anderson e coll., 1979).

La babesiosi canina è un esempio di come la biologia molecolare abbia rivoluzionato la classificazione degli agenti di babesiosi, in quanto è stato possibile rilevare la presenza di 4 grandi babesie e 3 piccole babesie. Fra le grandi babesie: *B. canis* è stata prima riclassificata in 3 sottospecie: *B. canis canis*, *B. canis rossii* e *B. canis vogeli*; questi 3 parassiti sono ora considerati 3 specie diverse (Zahler M. e coll., 1998; Carret e coll., 1999). La quarta grande babesia non ha ancora un nome (*Babesia* spp.), ed è stata recentemente descritta in cani con segni clinici ed ematologici di babesiosi nel Nord della Carolina (Birkenheuer e coll., 2004; Lehtinen e coll., 2008). Le piccole babesie sono finora state differenziate in tre specie di babesia distinte geneticamente e clinicamente: *B. gibsoni*, *B. conradae* (USA, riportata inizialmente come *B. gibsoni*) (Conrad e coll., 1991; Kjemtrup e coll., 2006) e una *Babesia microti-like* (poi denominata *Theileria annae*) (Zahler e coll., 2000; Camacho e coll., 2001).

Anche nei suini sono state segnalate infezioni da *Babesia* spp.: *B. trautmanni*, è stata riportata in U.R.S.S., Europa del Sud e Africa (Riek, 1968), mentre *B. perroncitoi* è stata segnalata in Nord Africa e Sardegna; in Senegal sono stati riportati 800 casi (Riek, 1968; Vercruysse e Parent, 1981).

Negli ultimi anni ha assunto un maggior interesse anche la babesiosi umana: la prima osservazione che l'uomo poteva infettarsi con *Babesia* spp. è stata riportata nel 1904 da Wilson e Chowning, che videro delle inclusioni piriformi intraeritrocitarie simili a quelle descritte da Smith e Kilbourne, nel sangue di pazienti con la "Febbre delle Montagne Rocciose" nell'ovest degli USA. Essi chiamarono tale agente *Pyroplasma hominis*. Il primo caso documentato di babesiosi umana in Europa è stato nel 1957, anno in cui un contadino splenectomizzato in Jugoslavia è stato diagnosticato infetto da *B. bovis* (Skrabalo e Deanovic, 1957). Le successive osservazioni mostrarono che molti casi in Europa erano dovuti a *B. divergens*. La difficoltà di un'accurata diagnosi di *B. divergens* dallo striscio di sangue, ha fatto in seguito pensare che anche il primo caso in Jugoslavia fosse probabilmente dovuto a questo parassita (Homer e coll., 2000).

In USA il primo caso di babesiosi umana attribuito a *B. microti* è stato riportato da Scholtens e coll. nel 1968 in California in un uomo di 46 anni residente a San Francisco che era stato splenectomizzato 4 anni prima (Kjemtrup e Conrad, 2000). Nello stesso anno, Fitzpatrick e coll. (1968; 1969), riportarono un caso fatale di babesiosi dovuto a *B. divergens* in un pescatore nord irlandese di 48 anni.

Nel 1970, Western e coll. (1970), e Ristic e coll., (1971) in USA riportarono il primo caso di babesiosi umana causato da *B. microti* in una donna di 59 anni non splenectomizzata residente nell'isola di Nantucket (Healy e Ristic, 1988), mentre nel 1981 un altro caso è stato riportato in California in un paziente splenectomizzato; questo caso ebbe la particolarità di presentare una elevata parassitemia (30%)



(Bredt e coll., 1981).

Il primo caso documentato di babesiosi umana in Svezia, è stato riportato nel 1989, in un paziente di 34 anni, splenectomizzato nel 1975 per lesioni traumatiche. Esso presentava febbre, mialgia, disuria, urine scure e presto il quadro si complicò con anuria, progressiva anemia emolitica, trombocitopenia, fibrinolisi. In seguito all'osservazione microscopica dello striscio di sangue fu fatta diagnosi di babesiosi da *B. divergens* (forme parassitarie a tetrade e assenza di pigmenti malarici). La diagnosi microscopica è stata poi successivamente confermata dall'inoculazione nel gerbillo e dall'esame sierologico (Uhnöo e coll., 1992).

Negli anni successivi furono riportati altri casi umani in America e, più raramente, in Europa; per anni si pensò quindi ad una distinzione epidemiologica netta fra le infezioni americane, imputate a *B. microti*, e quelle europee legate a *B. divergens*. Anche in questo caso l'avvento della biologia molecolare ha rivalutato le conoscenze in questo campo.

Nel 1993, fu riportato un caso in California in un soldato con parassitemia di 1.2%, sintomatologia e titolo anticorpale elevato 1:640 per *B. gibsoni* (piroplasma del cane in California) e 1:80 per *B. microti*; l'isolato venne nominato CA1 (Jerant e Arline, 1993). Nello stesso mese un caso di babesiosi venne osservato nello stato di Washington (Quick e coll., 1993) in un paziente di 41 anni non esposto ad alcun fattore di rischio. Il test sierologico rilevò un titolo molto alto per *B. gibsoni* (1:2560) e la caratterizzazione molecolare rilevò una maggiore somiglianza a *B. gibsoni* rispetto a *B. microti* (Thomford e coll., 1994). Questo nuovo agente fu chiamato WA1. Dal 1992 al 1993 in California vennero descritti altri 3 casi uno dei quali risultò fatale (Persing e coll., 1995); questi tre pazienti presentavano un titolo anticorpale molto elevato verso WA1 e nessun titolo per *B. microti* (Persing e coll., 1992). Nel 1994, WA1 fu ritrovato nello stato di Washington in un paziente anziano operato, che aveva ricevuto numerose trasfusioni (Herwaldt e coll., 1997).

Nel 1992, in Missouri, in un uomo di 73 anni splenectomizzato fu diagnosticata una babesiosi in seguito all'osservazione microscopica del parassita. La caratterizzazione antigenica e genetica identificò come agente responsabile *B. divergens*, nonostante alcune differenze antigeniche rispetto agli isolati europei di *B. divergens*. L'agente di questo primo caso in Missouri fu nominato MO1 (Herwaldt e coll., 1996).

Nel 1998 fu riportato anche il primo caso di babesiosi umana in Italia in un paziente di 55 anni splenectomizzato e recentemente sottoposto a chemioterapia per linfoma, con sintomatologia di modesta entità. In seguito, nel 2000, un caso di babesiosi umana fu segnalato in Austria in un soggetto di 56 anni anch'esso splenectomizzato, con anamnesi di puntura da zecca 2 settimane prima della comparsa della sintomatologia, che era comunque stata di lieve entità. Dall'analisi molecolare di entrambi i campioni, è stata identificata una *Babesia* spp., filogeneticamente correlata a *B. divergens* e a *B. odocoilei*, probabilmente una nuova specie indicata come EU1 (Herwaldt e coll., 2003) e successivamente denominata *B. venatorum*; questa specie fu poi segnalata in caprioli in Slovenia (Duh e coll., 2005b) e Svizzera (Hilpertshauser e coll., 2006); poi, nel gennaio 2005 e Gennaio 2006, è stata individuata anche in caprioli in Francia (presenti nel "Wild Fauna Reserve of Chizé"), grazie ad un lavoro svolto da Bonnet e coll. (2007) dell'Istituto Nazionale della Ricerca Agronomica di Nantes. Infine, in tempi più recenti questa specie è stata riscontrata anche in caprioli della zona di Verona

(Tampieri e coll., 2008) ed in zecche raccolte in Austria (Blaschitz e coll., 2008), in Lussemburgo (Reye e coll., 2010) e nella provincia di Vicenza (Cassini e coll., 2010).

Questi isolamenti hanno confermato che la presenza di *Babesia* sp. EU1 non è limitata ad una ristretta area geografica in Europa.

## 2.2 CLASSIFICAZIONE E DESCRIZIONE

Regno: Protozoa

Phylum: Apicomplexa (Levine e coll., 1971)

Classe: Aconoidasida (Mehlhorn e coll., 1980)

Ordine: Piroplasmida (Wenyon, 1926)

Famiglia: Babesiidae, Genere: *Babesia* (Starcovici, 1893)

Famiglia: Theilariidae, Generi: *Theileria* Bettencourt, Franca e Borges, 1907;  
*Cytauxzoon* Wagner, 1976.

*Babesia* e *Theileria* sono due generi appartenenti all'ordine piroplasmida, con rilevante importanza quali agenti di malattie di interesse veterinario e non solo.

La distinzione primaria fra questi due generi è l'assenza di un ciclo pre-eritrocitario in *Babesia* spp. e l'assenza di trasmissione transovarica in *Theileria* spp. (Kakoma e Mehlhorn, 1993; Riek, 1968; Telford III e coll., 1993).

### 2.2.1 BABESIA SPP

Inizialmente, le varie specie del genere *Babesia* furono identificate in base a parametri morfologici della forma intraeritrocitaria (trofozoiti) visibili negli strisci di sangue di animali vertebrati infetti. Questa analisi, insieme alla specificità dell'ospite, ha permesso di classificare le varie specie di *Babesia* (Tabella 1).

Da un punto di vista puramente pratico le babesie sono oggi distinte in due grandi gruppi in base al diametro delle loro forme intraeritrocitarie; si parla quindi di "piccole" babesie (1,0-2,5  $\mu\text{m}$ ) e "grandi" babesie (2,5-5,0  $\mu\text{m}$ ). Alle prime appartengono ad esempio *Babesia gibsoni*, *B. microti*, *B. divergens*, *B. equi* e *B. rodhaini*, mentre le seconde comprendono *B. bovis*, *B. caballi* e *B. canis*. La differenza delle dimensioni è legata al numero di cellule figlie che nascono dal piroplasma parentale: ve ne sono quattro nelle piccole babesie, con la classica forma a tetrade, mentre solo due nelle babesie grandi (Telford III e coll., 1993).

Importante in questo genere è l'assenza di forme pre-eritrocitiche o extraeritrocitiche, con gli sporozoiti che colonizzano direttamente i globuli rossi. Questo dato, oltre a rappresentare la principale differenza tra *Babesia* spp. e *Theileria* spp., pone anche dei dubbi sulla giusta classificazione di almeno due specie di babesia: *B. equi* e *B. microti*, nelle quali sarebbe invece presente una forma extraeritrocitaria (Mehlhorn e Schein, 1984). Questa caratteristica insieme all'apparente mancanza di trasmissione trans ovarica nella zecca, suggerisce che queste due specie potrebbero forse essere riclassificate proprio nel genere *Theileria* (Telford III e coll., 1993). Inoltre, studi genetici sul DNA ribosomiale di cinque specie di *Babesia* (Dalrymple e coll., 1992; Ellis e coll., 1992) classificano *B. bovis*, *B. bigemina* e *B. canis* come *Babesia* "in sensu stricto", mentre *B. microti* e *B. gibsoni* sembrerebbero più strettamente collegate alle theilerie.

SPECIE	OSPITE VERTEBRATO	OSPITE INVERTEBRATO	DISTRIBUZIONE	DIMENSIONI
<b>B. bovis</b>	Bovino, uomo	<i>Ixodes</i> spp., <i>Rhipicephalus</i> spp.	Europa, Asia, America, Africa; Australia	piccola 2,0 x 1,5 µm
<b>B. bigemina</b>	Bovino, ungulati selvatici	<i>Rhipicephalus</i> spp., <i>Haemaphysalis</i> spp.	Europa, America, Africa, Australia	grande 4,5 x 2,0 µm
<b>B. divergens</b>	Bovino, ungulati selvatici, uomo	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa	piccola 2,0 x 1,0 µm
<b>B. major</b>	Bovino	<i>Haemaphysalis punctata</i> , <i>Rhipicephalus</i> ( <i>Boophilus</i> ) spp.	Europa, Africa, Sud America, Unione Sovietica	grande 2,6 x 1,5 µm
<b>B. jakimovi</b>	Bovino, ruminanti selvatici	<i>Ixodes ricinus</i>	Siberia, Russia	grande 2,0-4,5 x 1,5- 2,1 µm
<b>B. ovata</b>	Bovino	<i>Haemaphysalis</i> spp.	Giappone	grande 4,5x 2,5 µm
<b>B. occultans</b>	Bovino	<i>Hyalomma</i> spp.	Sud-Africa	grande 4,5x 2,5 µm
<b>B. ovis</b>	Ovino, caprino	<i>Rhipicephalus</i> spp.,	Europa, Africa, Asia	piccola 1.0 x 2.5 µm
<b>B. motasi</b>	Caprino	<i>Haemaphysalis punctata</i> , <i>Rhipicephalus bursa</i> , <i>Dermacentor silvarum</i>	Europa, Asia, Africa	grande 2.5-4.0 x 2.0 µm
<b>B. trautmanni</b>	Suino	<i>Rhipicephalus</i> spp., <i>Hyalomma</i> spp., <i>Dermacentor</i> spp.	Europa, Africa	grande 2.5-4.0 x 1.5- 2.0 µm
<b>B. perroncitoi</b>	Suino	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Dermacentor reticulatus</i>	Europa	piccola 0.7-2.0 µm
<b>B. equi</b>	Equidi (cavallo, mulo, asino, zebra)	<i>Dermacentor</i> spp., <i>Hyalomma</i> spp., <i>Rhipicephalus</i> spp.	Europa, Asia, Africa, America, Australia,	piccola 1.9 x 1.0 µm (forme singole)
<b>B. caballi</b>	Equidi (cavallo, mulo, asino)	<i>Dermacentor</i> spp., <i>Hyalomma</i> spp., <i>Rhipicephalus</i> spp.	Europa, Asia, Africa, America, Australia,	grande 2.15-4.0 x 2.0 µm
<b>B. canis canis</b>	Cane, lupo, sciacallo	<i>Dermacentor</i> spp.	Europa, America, Asia	grande 5,0 x 2,5 µm
<b>B. canis vogeli</b>	Canidi	<i>Rhipicephalus</i> spp.	Stati Uniti, Sud della Penisola Iberica, Nord Africa	grande 5,0 x 2,5 µm
<b>B. canis rossi</b>	Canidi	<i>Haemaphysalis</i> spp.	Asia, Sud Africa	grande 5,0 x 2,5 µm
<b>B. gibsoni</b>	Canidi	<i>Rhipicephalus</i> spp., <i>Haemaphysalis</i> spp.	Asia, Africa	piccola 1,2 x 3,2 µm
<b>B. felis</b>	Gatto, leopardo, leone, puma, lince	<i>Haemaphysalis</i> spp.	Europa, Asia, Africa	piccola 1,5 x 2,0 µm
<b>B. odocoilei</b>	Cervo della Virginia, <i>Ovis canadensis nelsoni</i> , <i>Odocoileus hemionus</i> , <i>rangifer tarandus caribou</i>	<i>Ixodes scapularis</i> , <i>Amblyomma americanum</i>	America	piccola 2,0 x 1,0 µm
<b>B. capreoli</b>	<i>Cervus nippon</i> , <i>Cervus elaphus</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa	piccola 0,8 x 1,5 µm
<b>B. microti</b>	Roditori, Uomo	<i>I. dammini</i>	Stati Uniti, Europa	piccola 1,5 x 2,5 µm
<b>B.EU 1</b>	Cervidi, Uomo	<i>I. ricinus</i>	Europa	piccola 1,0 x 3,0 µm

Tabella 2.1: Principali specie di *Babesia* riconosciute nelle diverse specie animali (Morisod e

coll, 1972; Hoyte, 1976; Purnell, 1981; Soulsby, 1982; Reyers e coll., 1998; Zahler e coll., 1998; Carret e coll., 1999 Navarrete e coll., 1999; Cacciò e coll., 2002; Boozer e Macintire., 2003; Bonnet e coll.,2007).

Oltre alle specie sopra elencate, sono state descritte più di 100 specie di *Babesia*, che infettano un'ampia varietà di vertebrati. Si sospetta, comunque, che molte di queste descrizioni possano essere riferite a specie uguali o simili non distinguibili con i metodi tradizionali (Persing e coll., 1995). I metodi tradizionali di classificazione sono stati gradualmente soppiantati da più recenti metodiche di biologia molecolare. Ci sono diverse motivazioni che attualmente giustificano l'uso della biologia molecolare per la classificazione di *Babesia* spp. piuttosto che l'utilizzo di metodi basati su parametri morfologici e di specificità di specie. Parassiti differenti possono sembrare nello stesso ospite morfologicamente simili (es. *Plasmodium* e alcune specie di *Babesia*). Lo stesso parassita può avere caratteristiche microscopiche differenti in ospiti diversi, probabilmente per fattori specifici dell'ospite, come la funzionalità splenica e la predisposizione immunitaria (es. *B. divergens* ha il suo aspetto "caratteristico" negli eritrociti bovini, ma nell'uomo mostra elevato pleomorfismo, che complica la sua diagnosi).

La classificazione di *Babesia* spp. in base alla specificità dell'ospite, sembra essere meno utile di quanto una volta si pensasse, poiché alcune specie abbondantemente studiate, come *B. microti*, hanno mostrato avere un ampio range di ospiti (Etkind e coll., 1980; Brandt e coll., 1977; Moore e Kuntz, 1981, Ruebush e coll., 1981a; Spielman e coll., 1981).

Come detto in precedenza, le babesie possono essere distinte in "piccole babesie" e "grandi babesie". Questa classificazione morfologica si è dimostrata generalmente coerente con la classificazione filogenetica basata sulle sequenze della subunità minore del DNA ribosomiale, che mostra che le piccole e grandi babesie rientrano in due differenti clusters; *Theileria* spp. è maggiormente correlata alle piccole babesie piuttosto che alle grandi. Un'eccezione a quanto detto riguarda *B. divergens*, che appare piccola nello striscio di sangue (0.4-1.5 µm), ma è geneticamente correlata alle grandi babesie (Fig.2.1).

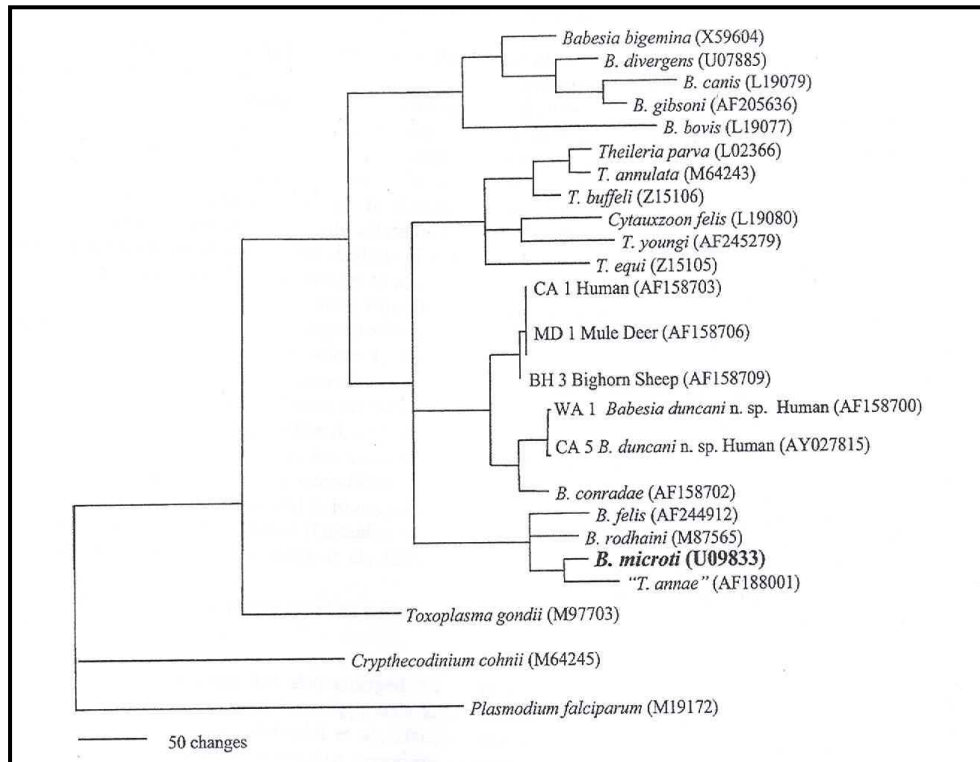


Figura 2.1: Albero filogenetico di *Babesia* spp. ottenuto dall'analisi del 18S rRNA (Hunfeld e coll. 2008).

Alcune sequenze di *B. microti* hanno mostrato elevata similarità sia con *Theileria annulata* (91%), un patogeno del bovino, sia con altre babesie (es. *B. bigemina* è per l'88% simile a *B. microti*) (Persing e coll., 1992). Questa è stata la prima evidenziazione biomolecolare che le piccole babesie sono evolutivamente collegate a *Theileria* spp. (Persing e coll., 1992) e come *Theileria* spp. anche le piccole babesie sembra non vengano trasmesse per via transovarica nelle zecche, portando a sostenere che le piccole babesie dovrebbero essere riclassificate nel genere *Theileria*. (Mehlhorn e Schein, 1984; Telford III e coll., 1993). La descrizione dello stadio extraeritrocitario in *B. equi* (Mehlhorn e Schein, 1984; Schein e coll., 1981) ha portato alla riclassificazione di questa specie come *T. equi* (Mehlhorn e Schein, 1998). E' stato indicato un ciclo pre-eritrocitario anche in *B. microti*, ma sono necessari ulteriori studi.

Anche nel caso del cane la biologia molecolare ha permesso di differenziare le piccole babesie, in precedenza considerate un'unica specie (*B. gibsoni*), in tre 3 specie di *Babesia* distinte geneticamente e clinicamente: *B. gibsoni*, *B. conradae* diffusa in USA (Conrad e coll., 1991; Kjemtrup e coll., 2006) e più recentemente una specie definita inizialmente *Babesia microti-like* ed ora denominata *Theileria annae* (Zahler e coll., 2000; Camacho e coll., 2001), descritta in Spagna. Recentemente, sempre nel cane, è stata anche segnalata una nuova specie di *Babesia*, responsabile di casi clinici nel Nord Carolina, identificata con tecniche molecolari, per la quale non è ancora stato definito un nome, ed è chiamata solo *Babesia* sp.

L'analisi molecolare sembra quindi un utile strumento per meglio definire sia le relazioni filogenetiche fra *Babesia* e *Theileria* (Persing e coll., 1992; Quick e coll., 1993), sia per scoprire nuovi e/o non conosciuti patogeni. Un esempio è la scoperta

di WA1 (Quick e coll., 1993; Thomford e coll., 1994). Come già accennato precedentemente, nel 1991 una sindrome acuta simile a malaria in un paziente è stata attribuita a un nuovo piroplasma simile a *Babesia* spp., indicato come WA1. Sebbene WA1 sia morfologicamente simile a *B. microti*, sono state evidenziate numerose differenze, compresa la cross-reattività antigenica (Quick e coll., 1993), la virulenza nel criceto (100% di mortalità entro 10 gg), e il polimorfismo della lunghezza del frammento di restrizione del DNA digerito (RFLP, Restriction fragment length polymorphism) (Quick e coll., 1993; Thomford e coll., 1994). Tutti questi dati indicano che WA1 è un nuovo patogeno umano, distinto da *B. microti*. Studi successivi riguardanti la determinazione delle sequenze della subunità ribosomiale e il confronto con altre sequenze di piroplasmi hanno mostrato che WA1 è molto correlato a *B. gibsoni*. Filogeneticamente, WA1 rientra in un cluster che include *T. equi* (*B. equi*) e tutte le theilerie conosciute.

L'analisi molecolare del 18S rRNA di *B. microti* ha permesso invece, recentemente, di suddividere questa specie in 3 Clade: il Clade 1 comprende parassiti dei roditori che possono essere causa di zoonosi; il Clade 2 comprende i parassiti dei carnivori e il Clade 3 comprende nuovamente parassiti dei roditori che però non sono coinvolti nella possibile trasmissione all'uomo (Hunfeld e coll., 2008).

Ancora, un controllo tramite PCR aspecifica di campioni da babbuini in varie colonie presenti negli Stati Uniti, non solo ha scoperto una "nuova" specie di *Babesia* (PB-1) (Bronsdon e coll., 1998), ma ha dimostrato che più del 40% di babbuini in queste colonie erano infetti (Homer e coll., 2000). La nuova specie scoperta è correlata a *B. microti* e potrebbe essere l'organismo precedentemente descritto come *Entopolypoides* (Bronsdon e coll., 1998;).

In Europa e negli USA sono state di recente individuate nuove *Babesia* spp. in base all'analisi della subunità ribosomiale 18S e della sequenza ITS2. Queste nuove babesie sono *B. venatorum* (EU1-3), identificata da Herwaldt e coll. (2003) e confermata da Häselbarth e coll. (2007) per quanto riguarda l'Europa ed una specie *B. divergens*-like (Gray, 2006) per gli USA. *Babesia* EU1 rientra in un cluster insieme a *B. odocoilei*, un parassita del cervo dalla coda bianca, e *B. divergens* (Herwaldt e coll., 2003); sempre *Babesia* EU1 non è invece strettamente correlata ad altre specie come *B. microti* e *B. duncani* (Herwaldt e coll., 2003; Conrad e coll., 2006). L'analisi filogenetica di *B. venatorum* infatti, evidenzia analogie con *B. odocoilei*, parassita del cervo negli USA; queste due specie inoltre sono correlate a *B. divergens*. I ceppi *B. divergens*-like isolati in Missouri (MO1) (Herwaldt e coll., 2003), nello Stato di Washington (Herwaldt e coll., 2004) e nel Kentucky (Beattie e coll., 2002) presentano una notevole omologia del 18S con *B. divergens*. Il segmento 18S dell'isolato del Kentucky e di quello del Missouri sembra essere identico a quello di *B. divergens* isolato dal silvilago (*Sylvilagus floridanus*), un ospite inusuale per questa babesia dell'isola di Nantucket descritto da Goethert e Thelford (2003) (Holman e coll., 2005; Gray, 2006). Confrontando però la sequenza nucleotidica del segmento amplificato con quella di tre isolati bovini di *B. divergens* depositata in GenBank (U13670, Z48751 e U07885) si evidenzia come i ceppi americani abbiano una percentuale di omologia del 99,6-99,7%. E' stato inoltre sequenziato l'intero frammento 18S dei tre isolati bovini, in aggiunta ad altri quattro (Herwaldt e coll., 2003) e sono stati trovati tutti identici, con un'omologia del 100%. Da questo, secondo Hunfeld e coll. (2008), si può dedurre che definire come *B. divergens* ceppi che presentino un'analogia inferiore al 100% sia discutibile.

### 2.2.2 THEILERIA SPP.

I parassiti appartenenti al genere *Theileria* sono agenti di diverse sindromi in ruminanti domestici e selvatici e sono responsabili di gravi perdite economiche che annualmente raggiungono le centinaia di milioni di dollari in Africa Sub-Sahariana ed Asia (Bishop e coll., 2004).

L'analisi della sequenza del gene del 18S rRNA ha dimostrato che il genere *Theileria* è strettamente correlato a *Babesia* (Allsopp e coll., 1994).

Nel genere *Theileria* sono stati inseriti anche alcuni parassiti che in precedenza erano stati classificati come generi a parte, ma entrambi compresi nella famiglia Theileridae: *Gonderia* e *Haematoxenus*; l'unica eccezione è rappresentata dal genere *Cytauxzoon*, comprendente parassiti dei felini in Nord America, e che gode di una classificazione a parte (Wagner, 1976; Glenn e Stair, 1984). Inizialmente erano state identificate almeno 39 specie, associate ai rispettivi ospiti su cui sono state rinvenute; tra le principali da ricordare ci sono:

- *T. annulata* in: *Bos taurus*, *B. indicus*, *Bubalus bubalis*, *Bison bison*;
- *T. aristotelis* in: *Cervus unicolor*;
- *T. barnettii* in: *Syncerus caffer*;
- *T. brimonti* in: *Bradypus tridactylus*;
- *T. mutans* in: *Bos taurus*, *B. indicus*, *B. bubalis*, *Syncerus caffer*;
- *T. parva* in: *B. taurus*, *B. indicus*, *B. bubalis*, *S. caffer*, *Kobus defassa*;
- *T. rossica* in: *Apodemus agrarius*;
- *T. separata* in: *Ovis aries*;
- *T. cervi* in: *Dama dama*, *Odocoileus virginianus*, *Muntiacus munta*;
- *T. sylvicaprae* in: *Sylvicapra grimmia*
- *T. velifera* in: *B. taurus*, *B. indicus*;
- *T. taurotrago* in: *Taurotragus oryx*, *B. taurus*, *B. indicus* (Levine, 2000).

In generale, in molti casi, il nome assegnato al parassita si deve al primo ospite ritenuto originariamente specifico (per es. *T. sylvicaprae*); questo concetto è oggi messo ampiamente in discussione dai più recenti metodi di identificazione, che hanno dimostrato ad esempio come alle *Theilerie* presenti in Africa appartenga un range di ospiti specifici molto più ampio di quanto il nome possa indicare. Parassiti di ungulati africani dapprima classificati nel genere *Cytauxzoon* rientrano oggi invece nel genere *Theileria* (ad es. *T. taurotrago*) (Grootenhuis e coll., 1979).

Un'ulteriore complicazione nella classificazione di *Theileria* spp. si ha, come accennato precedentemente, sia per *Babesia equi* che per *B. microti*: gli sporozoiti di questi due parassiti possono invadere i linfociti dell'ospite e svilupparsi in forme simili agli schizonti di *Theileria* (Schein e coll., 1981; Rehbein e coll., 1982; Mehlhorn e Schein, 1984). In questi casi è ancora in atto una serie di controversie circa la classificazione di alcuni parassiti nel genere *Theileria* o *Babesia*, o in altri generi ancora come ad esempio *Nicolliia* (Young e Morzaria, 1986).

Nel tempo sono stati vari i parametri che hanno permesso di suddividere *Theileria* spp. in specie e ceppi, ma la ridotta disponibilità di mezzi ha spesso portato in passato, ad un'identificazione approssimativa e talvolta errata dei parassiti. A questo si aggiunge l'uso di una terminologia spesso generica e poco definita "ceppo", che ha indotto gli studiosi a classificare certi parassiti in un determinato



gruppo secondo criteri senza un concreto valore identificativo, come ad esempio il rinvenimento in una nuova area.

Per ovviare a una confusione nata per motivi simili nei tripanosomi, la World Health Organization (WHO) nel 1978, aveva stabilito che una commissione formulasse un'appropriata nomenclatura che potesse agevolare i tassonomisti nell'identificare l'appartenenza di un parassita ad una specie piuttosto che ad un'altra. Uno studioso, Irvin (1987), stabilì che tale lavoro dovesse essere intrapreso anche nei confronti di *Theileria*. Fu quindi proposta una serie di definizioni, in accordo con le quali il termine ceppo sarebbe in seguito stato utilizzato solo per popolazioni parassitarie definite con precisione, e laddove tale certezza non venga raggiunta, i termini "isolato" e "stock" sarebbero stati preferiti a seconda della circostanza; l'identificazione di ceppo si ha sulla base di caratteristiche biologiche altamente specifiche, come ad esempio i profili immunoreattivi.

Le più importanti specie di *Theileria*, dal punto di vista economico, che infettano il bestiame ed i piccoli ruminanti sono trasmesse da zecche ixodidae dei generi: *Rhipicephalus* spp., *Amblyomma* spp., *Hyalomma* spp. and *Haemaphysalis* spp.

SPECIE	OSPITE VERTEBRATO	OSPITE INVERTEBRATO	DISTRIBUZIONE	DIMENSIONI
<i>T. parva</i>	Bufalo africano ( <i>Syncerus caffer</i> )	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> <i>R. zambesiensis</i> <i>R. duttoni</i>	Est, Sud e Centro Africa	1,5-2,0 x 0,1-1,0 µm
<i>T. annulata</i>	Bufalo d'acqua ( <i>Bubalus bubalis</i> )	<i>Hyalomma anatolicum</i> e altre specie di <i>Hyalomma</i>	Sud Europa, Ovest, Est e Sud Asia e Nord Africa	0,5-2,0 x 0,5-2,7 µm
<i>T. mutans</i>	Bovini africani	<i>Amblyomma variegatum</i> e altre quattro specie di <i>Amblyomma</i>	Ovest, Est, Centro e Sud Africa, Caribbean islands	1,0-1,5 x 0,6-2,0 µm
<i>T. velifera</i>	<i>B. taurus</i> , <i>B. indicus</i>	<i>Amblyomma variegatum</i> e altre specie di <i>Amblyomma</i>	Ovest, Est, Centro e Sud Africa	1,0 x 2,0 µm
<i>T. taurotragi</i>	<i>Taurotragus oryx</i> , <i>B. taurus</i> , <i>B. indicus</i>	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> <i>R. zambesiensis</i> <i>R. pulchellus</i>	Est, Centro e Sud Africa	1,0 x 2,0 µm
<i>T. sergenti</i>	Bovini Asia orientale	Varie specie di <i>Haemaphysalis</i>	Giappone e Corea	1,0 x 2,0 µm
<i>T. buffeli</i>	Bovini Asia orientale	Varie specie di <i>Haemaphysalis</i>	Europa, Asia, Australia, Est Africa	1,0 x 2,0 µm
<i>T. lestoquardi</i> *	Piccoli ruminanti	Varie specie di <i>Hyalomma</i> , <i>R. bursa</i>	Asia, Nord ed Est Africa, Europa meridionale	0,6 x 2,0 µm
<i>T. ovis</i> *	Piccoli ruminanti	Varie specie di <i>Hyalomma</i> , <i>R. bursa</i> , <i>R. evertsi</i>	Asia, bacino del Mediterraneo ( <i>R. bursa</i> ) e Africa ( <i>R. evertsi</i> )	1,0-2,5 µm
<i>T. separata</i> *	<i>Ovis aries</i>	Varie specie di <i>Hyalomma</i> , <i>R. evertsi</i>	Asia e Africa sub Sahariana	1,0 x 2,0 µm
<i>T. cervi</i>	Daino, capriolo <i>Muntiacus munta</i>			1,0 x 2,0 µm

Tabella 2.2: Specie di *Theileria* che possono infettare i ruminanti domestici, loro vettore e distribuzione geografica. \* indica le specie di *Theileria* che infettano i piccoli ruminanti

(Levine, 2000; Bishop e coll., 2004; Capelli e coll., 2010).

## 2.3 CICLO BIOLOGICO

### 2.3.1 BABESIA SPP.

Il genere *Babesia* presenta tre stadi di riproduzione (Kakoma e coll., 1993):

gametogonia: formazione e fusione dei gameti all'interno della zecca,

sporogonia: riproduzione asessuata all'interno delle ghiandole salivari della zecca,

merogonia: riproduzione asessuata all'interno dell'ospite vertebrato.

Una delle specie più studiate e conosciute è *B. microti*, e gran parte del ciclo di *Babesia spp.* all'interno della zecca, è stato conosciuto tramite studi su di essa (Telford III e coll., 1993). Non è però ancora del tutto chiara l'esatta sequenza di eventi che avvengono a partire dall'ingestione delle forme eritrocitarie da parte della zecca ospite.

#### 2.3.1.1 Ciclo all'interno della zecca:

Dal momento in cui la zecca ha compiuto il suo pasto di sangue sull'ospite vertebrato infetto, *B. microti* può essere evidenziata dopo 10 ore all'interno di eritrociti intatti presenti nell'intestino dell'artropode. A questo punto si può anche rilevare un organello intracellulare, detto citostoma, all'interno del parassita (Rudzinska e coll., 1984). Questa struttura endocellulare e i vacuoli ad essa associati non sono presenti nelle fasi intraeritrocitarie di *B. microti*, ma lo sono invece in quelle di *B. equi* e delle theilerie; sembra quindi esserci una maggiore affinità tra *B. equi* ed il gruppo delle theilerie e, al contrario, potrebbe indicare *B. microti* come una forma intermedia tra *Theileria* e *Babesia sensu stricto* (Mehlhorn e Schein, 1984).

Dopo circa 46-60 ore dal pasto, i parassiti sono ancora rilevabili all'interno degli eritrociti, ma all'interno dei gametociti si iniziano a sviluppare nuovi organelli; il più evidente è lo sviluppo di un organello a forma di punta di freccia, chiamata Strahlenkorper (o corpo radiato) (Koch, 1906); in tutte le infezioni studiate sostenute da *Babesia* e *Theileria spp.* sono stati rilevati protozoi contenenti questa struttura a punta di freccia all'interno della zecca (Kakoma e coll., 1993). Queste formazioni rappresentano la forma sessuata, e ciò è stato confermato dimostrando la fusione di questi isogameti, che si liberano da eritrociti vicini: la struttura a punta di freccia è coinvolta nella fusione dei gameti (Kakoma e coll., 1993; Rudzinska e coll., 1983b) dalla quale origina in seguito uno zigote.

Lo zigote utilizza poi tale punta, che contiene enzimi litici, per penetrare nell'epitelio intestinale della zecca circa 80 ore dopo il pasto. Una volta penetrato nell'epitelio, entra nelle cellule intestinali mediante un processo d'invaginamento e al loro interno perde densità e si rimpicciolisce, per poi assumere una forma sferica e localizzarsi verso la membrana basale. Da qui raggiunge il circolo emolinfatico e passa allo stadio di kinete (zigote mobile). I kineti oltre a invadere direttamente le ghiandole salivari della zecca, invadono anche altre cellule, come il grasso corporeo o i nefroliti, e vanno verso il secondo ciclo di divisione (Telford III e coll., 1993). Questi secondi zigoti possono invadere l'ovario ed essere trasmessi così per via

transovarica. Questo tipo di trasmissione è riscontrata soprattutto nelle grandi babesie come *B. divergens*.

Una volta giunti nelle ghiandole salivari, i kineti invadono sia le cellule interstiziali sia quelle secretorie ed in seguito alla loro presenza si osserva una diffusa ipertrofia ghiandolare. Sempre in questa sede i kineti formano gli sporoblasti, i quali sono strutture multinucleate indifferenziate. Gli sporoblasti rimangono inattivi finché la zecca non si nutre nuovamente. Sapendo che la forma larvale si nutre in agosto-settembre (Wilson e Spielman, 1985) e la risultante ninfa si nutre nella tarda primavera successiva (Yuval e Spielman, 1990), possiamo dire che se una larva si infetta lo sporoblasto rimane dormiente per 9-10 mesi (Piesman e coll., 1987a).

Quando la ninfa infetta comincia a nutrirsi su un nuovo ospite, sembra che proprio l'aumento di temperatura conseguente al contatto con l'ospite vertebrato, sia lo stimolo utile a far sì che lo sporoblasto si espanda all'interno degli acini salivari fino a riempire l'intera cellula (Lewengrub e coll., 1988); la sporogenesi quindi è favorita dall'ingestione di sangue, ma il processo non avviene se non aumenta la temperatura (Telford III e Spielman, 1989). Mentre la ninfa continua a nutrirsi, la membrana singola che circonda lo sporoblasto s'invagina in numerosi punti, porzioni di nucleo si insinuano in tali ripiegamenti e si forma così una struttura con nucleo lobato.

Circa 46-65 ore dopo l'inizio del pasto della zecca cominciano a comparire nello sporoblasto gli organelli intracellulari tipici degli sporozoiti: micronemi, roptri e organelli a spirale (Karakashian e coll., 1983). Si ha infine la divisione del citoplasma e poi del nucleo per scissione multipla, portando così alla maturazione degli sporozoiti, i quali vengono poi liberati per gemmazione.

Gli sporozoiti maturi misurano  $2.2 \times 0.8 \mu\text{m}$ , presentano un roptri anteriore ed alcuni micronemi, ma non sono presenti microtubuli. Sembra, invece, che contengano ribosomi liberi, reticolo endoplasmatico liscio, strutture simili a mitocondri e organelli a spirale (Telford III e coll., 1993).

L'efficienza di trasmissione della zecca è attribuita alla sua saliva, che probabilmente facilita l'infezione con la sua attività antinfiammatoria o immunosoppressoria (Ribeiro, 1987); sperimentalmente è necessario inoculare almeno 10.000-25.000 sporozoiti di *B. microti* per infettare topo e criceto (Piesman e Spielman, 1982).

#### 2.3.1.2 Ciclo all'interno dell'ospite vertebrato:

Da ogni sporoblasto si formano 10.000 sporozoiti, che nelle ghiandole salivari della zecca raggiungono un quantitativo enorme, circa 100.000; molte migliaia vengono depositate nella pelle dell'ospite vertebrato, attorno all'apparato buccale della zecca, nelle ultime ore del pasto (Mehlhorn e Schein, 1984).

Sperimentalmente si è visto che il tempo di permanenza della zecca attaccata all'ospite vertebrato condiziona l'efficacia della trasmissione ai criceti e ai topi bianchi, ovvero più a lungo la zecca rimane attaccata e più è alta la possibilità di trasmissione degli sporozoiti. Se la zecca riesce a compiere un pasto completo, la percentuale di trasmissione è di circa il 100% (Piesman e coll., 1987a).

Una volta entrati nel vertebrato, gli sporozoiti infettano direttamente gli eritrociti.

Gli sporozoiti iniettati dalla zecca, nelle specie di babesie senza stato preeritrocitario) invadono gli eritrociti dell'ospite attraverso un processo di

invaginamento della membrana cellulare (Rudzinska e coll., 1976), formando dei vacuoli. Contemporaneamente i merozoiti perdono i roptri: questo fatto avvalorava l'ipotesi che questa struttura sia fondamentale per il processo d'invasione cellulare. Questa fase sembra essere facilitata dall'azione del complemento (soprattutto dal fattore C3), pur non essendo chiaro se questo agisca andando a modificare la membrana eritrocitaria o il merozoita stesso.

La membrana dei vacuoli si disintegra gradualmente e i parassiti rimangono a forma di piroplasma con membrana singola, a differenza delle specie di *Plasmodium*, che invadono con un meccanismo simile, ma conservano oltre alla loro anche la membrana dell'ospite (Rudzinska e coll., 1976). All'interno degli eritrociti dell'ospite, molti trofozoiti diventano merozoiti e si dividono tramite scissione binaria; questa riproduzione asessuata produce molti altri merozoiti, che lisano le cellule e continuano a infettare altri eritrociti. A volte si possono formare nello stesso momento quattro parassiti, e in questi casi si può osservare una forma definita "croce Maltese". La rapida riproduzione distrugge la cellula dell'ospite e porta ad emoglobinuria. Alcuni trofozoiti possono invece diventare potenziali gametociti (Mehlhorn e coll., 1980; Rudzinska e coll., 1979): non si riproducono, ma aumentano di dimensioni (Rudzinska, 1976). Questi gametociti si svilupperanno poi in gameti, prima di lasciare gli eritrociti, una volta arrivati all'interno della zecca (Rudzinska e coll., 1979). Una particolarità nel ciclo di trasmissione sembra essere presente per *B. gibsoni*: sembra infatti che possa essere trasmessa, tramite il morso, da cane a cane, senza quindi l'intervento del vettore (Birkenheuer e coll., 2005; Jefferies e coll., 2007b). A sostegno di quest'ipotesi vi è la segnalazione negli ultimi 10-13 anni di vari casi di babesiosi canina in paesi al di fuori dell'Asia, soprattutto negli American Pit Bull Terrier o razze simili, aumentando così la convinzione che questi casi si presentino in seguito a lotte o combattimenti tra cani infetti e non (Birkenheuer e coll., 2005; Yeagley e coll., 2009). Inoltre, dall'analisi della porzione di genoma codificante per l'ITS e per il 18S, a partire da vari isolati di *B. gibsoni* di diversi paesi del mondo, si è rilevato che le sequenze di queste porzioni erano conservate (Bostrom e coll., 2008) dando così la possibilità di ipotizzare che la mancanza di diversità genetica sia dovuta all'assenza della riproduzione sessuale (sporogonia) che avviene nella zecca. Di conseguenza i cani (in particolare quelli utilizzati per i combattimenti) e non più la zecca, diventerebbero il serbatoio del parassita (Irwin, 2009).

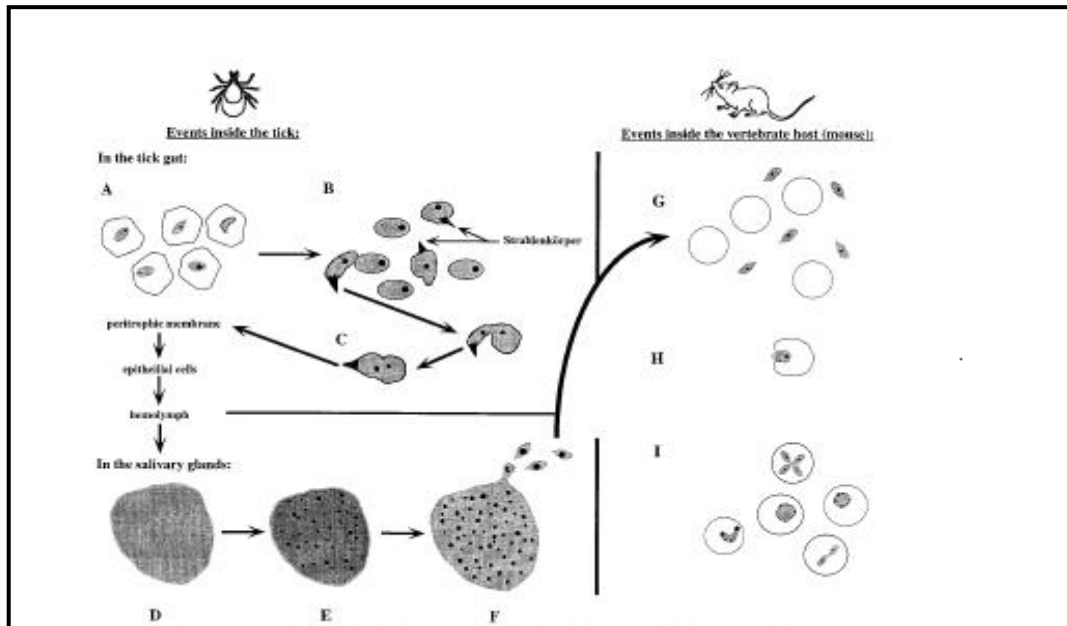


Figura 2.2: Ciclo di *Babesia* spp. nella zecca e nell'ospite vertebrato (Homer e coll., 2000)

### 2.3.2 *THEILERIA* SPP.

Come per tutti i piroplasmi, anche per *Theileria* spp. le varie fasi di sviluppo del parassita prevedono fondamentalmente due tappe, una all'interno dell'ospite invertebrato e una nell'ospite vertebrato. Tutti gli stadi del ciclo sono aploidi, ad eccezione dello zigote nell'intestino della zecca (Bishop e coll., 2004).

Come già detto in precedenza, l'identificazione di uno stadio pre-eritrocitario nell'ospite vertebrato differenzia *Theileria* spp. da *Babesia* spp., sebbene tale stadio sia stato definitivamente identificato in *T. equi* (*B. equi*) (Mehlhorn e coll., 1993; Schein e coll., 1981) e si sospetta essere presente anche in *B. microti* (Mehlhorn e coll., 1993). Lo stadio pre-eritrocitario è determinato da schizonti intralinfocitari che compiono una blastogenesi e un'espansione clonale nelle cellule T in *Theileria parva* e in quelle B in *T. annulata* (Baldwin e coll., 1988; Fawcett e coll., 1982; Spooner e coll., 1989).

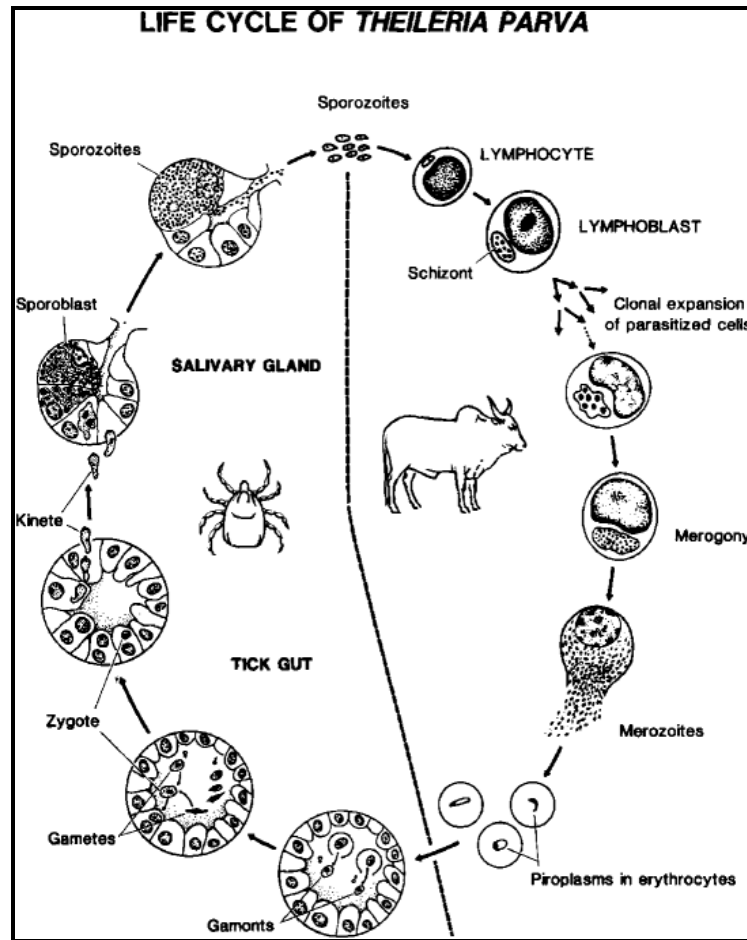


Figura 2.3: Ciclo di *Theileria parva* nel bovino e nella zecca vettrice *Rhipicephalus appendiculatus* (Bishop e coll., 2004).

### 2.3.2.1 Ciclo all'interno della zecca:

Il ciclo vitale all'interno della zecca è stato relativamente poco studiato a causa della difficoltà di coltura. Tutto inizia col pasto di sangue della zecca su un ospite infetto (servono zecche trifasiche e gli sporozoiti devono essere assunti allo stadio di larva o di ninfa in quanto non c'è trasmissione transovarica ma solo transtadiale) (Capelli e coll., 2010) con la conseguente assunzione di eritrociti infetti dai piroplasmi; in seguito ad un pasto completo di sangue, una zecca adulta può assumere milioni di eritrociti infetti, anche da animali con bassa parassitemia. Il volume di sangue ingerito da una larva o da una ninfa è invece molto minore, come minore è anche il numero di parassiti che sopravvivono e sviluppano nell'intestino (Bishop e coll., 2004). Già poco tempo dopo che la zecca ha ingerito i piroplasmi col sangue, è possibile rinvenire nel lume intestinale dell'artropode i gameti del parassita (Mehlhorn e Schein, 1984), anche se la maggior parte dei piroplasmi ingeriti, sembra che vengano distrutti nel lume intestinale probabilmente da fosfatasi acide secrete dall'epitelio (Shaw e Young, 1994). Poco dopo il completamento del pasto, si possono osservare i corpi radiati o Strahlenkorper, già descritti in *Babesia* spp (Mehlhorn e Schein, 1984; Kakoma e Mehlhorn, 1993). Il processo di gametogenesi appare simile nelle specie studiate, incluse *T. parva* e *T. annulata*, ma non ci sono elementi riguardo ai fattori scatenanti lo sviluppo dei gameti.

La formazione dello zigote deriva da due gameti strutturalmente simili (Shaw, 2003); lo zigote che si origina è sferico, invade le cellule epiteliali della mucosa intestinale della zecca e si differenzia in un kinete mobile. Non è noto in quale tipo di cellule intestinali lo zigote entri o quale sia il meccanismo del processo d'entrata in esse. È comunque possibile che una struttura a testa di freccia simile a quella descritta per *Babesia* sia coinvolta nel processo (Rudzinska e coll., 1983b).

Lo sviluppo intracellulare del parassita non avviene all'interno di un vacuolo parassitoforo, ma si presenta libero nel citoplasma.

I kineti di *Theileria* spp. si sviluppano solo all'interno delle cellule intestinali e sono tipicamente mononucleati (Bishop e coll., 2004).

Il kinete motile invade molto rapidamente le ghiandole salivari; questo processo è molto specifico ed i kineti non sono stati rilevati in nessun altro organo, incluso l'apparato riproduttivo (Shaw, 2003). Come già accennato, per *Theileria* spp. non è infatti presente la via di trasmissione transovarica. Per arrivare alle ghiandole salivari, il kinete passa nell'emolinfa dove diviene sporocinete (Capelli e coll., 2010); deve inoltre superare diverse barriere: membrana basale e lamina per poter uscire dalle cellule intestinali ed altre ancora per entrare nelle cellule degli acini delle ghiandole salivari. Queste ghiandole, nelle zecche ixodidae, presentano quattro tipi di acini: i tipi I, II e III sono presenti sia nei maschi sia nelle femmine, mentre il tipo IV è presente solamente nei maschi. Gli acini di tipo II, III e IV contengono diversi tipi di cellule secretorie distinte da lettere da "a" ad "h". Si è visto che i kineti mobili probabilmente riescono a riconoscere specificatamente gli acini di tipo III e sembra inoltre che riescano ad invaderli selettivamente. Questo potrebbe essere dovuto alla loro composizione in carboidrati che ne determina una maggior suscettibilità ad essere parassitati (Shaw, 2003). *Theileria* spp. sviluppa esclusivamente all'interno delle cellule e degli acini di III tipo, anche se è stato dimostrato che in zecche molto infestate da *T. annulata* anche le cellule degli acini di tipo II possono essere interessate (Mehlhorn e Schein, 1984). Una volta penetrati nelle cellule ghiandolari, i kineti si trasformano in sporoblasti primari e secondari da cui, in seguito, tramite sporogonia, si verranno a formare gli sporozoiti, che sono la forma infettante (Capelli e coll., 2010).

La sporogonia, che è l'unico stadio moltiplicativo all'interno della zecca, avviene nelle ghiandole salivari ed è tipicamente innescata dal pasto di sangue, nonostante sia stato dimostrato che può essere completata anche in ambiente in condizioni di elevata temperatura in parte degli acini (Young e Leitch, 1982).

Il numero di sporozoiti di *T. parva* prodotti nella femmina di *Rhipicephalus appendiculatus* durante la sporogonia è stato stimato essere all'incirca 30.000-50.000 per cellula acinare infetta, *T. taurotragi* può produrne fino a 140.000 (Norval e coll., 1992; Shaw e Young, 1994). Ci sono indicazioni che il numero di sporozoiti di *T. parva* nei maschi di *R. appendiculatus* siano meno che nelle femmine, ed è inoltre dimostrato che il numero di sporozoiti è minore nelle cellule delle ninfe rispetto che negli adulti; ciò può avere conseguenze sull'importanza dei diversi stadi della zecca nella trasmissione di *T. parva* (Ochanda e coll., 1996). *Theileria mutans*, nelle ghiandole salivari di *Amblyomma variegatum* produce meno sporozoiti, circa 5000, ma più grandi.

Una volta formati gli sporozoiti, la zecca ha assunto potere infettante, e tutto questo avviene in circa 48-72 ore (Fawcett e coll., 1982).

Una zecca con una sola cellula acinale infetta può determinare serie patologie, fino

anche alla morte; la gravità dell'East Coast Fever, causata da *T. parva*, è dipendente dalla quantità di sporozoiti ed inoltre ogni singolo animale presenta un livello di suscettibilità diverso. Alcuni animali infatti mostrano solo una lieve sintomatologia e sviluppano una risposta immunitaria protettiva (Bishop e coll., 2004).

#### 2.3.2.2 Ciclo all'interno del vertebrato:

*Theileria parva* presenta uno stretto range di ospiti vertebrati; una volta inoculati gli sporozoiti, questi invadono solo alcune cellule di bovini e bisonti e nel processo di penetrazione all'interno delle cellule è probabile che siano coinvolti specifici recettori localizzati sulle cellule dell'ospite (Shaw, 1997; Shaw, 2003). *T. parva* infetta le cellule della linea linfoide, mentre *T. annulata* quelle della linea mieloide (monociti/macrofagi), nonostante possa entrare anche nei linfociti B. Come per i virus trasmessi da *R. appendiculatus*, i componenti della saliva della zecca sembrano facilitare l'entrata degli sporozoiti di *T. parva* all'interno dei leucociti dell'ospite (Shaw e coll., 1993), anche se questi componenti possono essere implicati inoltre in un meccanismo di attivazione indiretta sempre dei linfociti.

Gli sporozoiti di *Theileria parva* non sono motili, a differenza di quelli delle altre theilerie (Shaw e coll., 1991). Nel processo di penetrazione delle cellule dell'ospite sono coinvolte la molecola di superficie maggiore degli sporozoiti di *T. parva* (p67) e le molecole di istocompatibilità (MHC) di classe I dell'ospite, mentre anticorpi monoclonali verso di loro inibiscono il processo (Musoke e coll., 1984; Shaw e coll., 1991). A causa però della stretta specificità per le cellule dell'ospite, sarebbe poco probabile che le uniche molecole coinvolte fossero solo quelle sopracitate. Sono, infatti, coinvolti altri fattori quali: mobilitazione delle riserve di calcio all'interno degli sporozoiti, proteasi del parassita e delle cellule dell'ospite, un segnale di trasduzione attraverso le cellule dell'ospite e le proteine chinasi e G del parassita (Shaw, 1997).

Lo sporozoita, una volta entrato nella cellula bersaglio, è rapidamente rivestito da una membrana cellulare prodotta dalla cellula stessa, che viene però rapidamente rimossa dal parassita stesso in meno di 15 minuti, riuscendo così ad evadere i meccanismi di difesa dell'ospite; da questo punto di vista *Theileria* è molto simile ad altri patogeni intracellulari come *Listeria*, *Shigella* e *Trypanosoma cruzi* (Andrews e Webster, 1991), probabilmente come risultato di un'evoluzione per ovviare al problema della sopravvivenza intracellulare. La rapida dissoluzione della membrana della cellula ospite da parte del parassita è strettamente correlata col rilascio del contenuto degli organelli degli sporozoiti, che grazie al "microtubule nucleating factor", vengono rapidamente circondati da una rete di microtuboli.

Gli sporozoiti, quindi, entrano inizialmente nei linfociti presenti nel linfonodo tributario della regione dove si è attaccata la zecca (spesso nella regione parotidea); a questo punto si ha la trasformazione dei linfociti in linfoblasti e la schizogonia degli sporozoiti, con formazione di macroschizonti; contemporaneamente alla schizogonia il parassita stimola i linfoblasti a dividersi rapidamente e nel contempo anche lui si divide per produrre due cellule infette (Capelli e coll., 2010). L'associazione degli schizonti col nucleo della cellula ospite fa sì che le cellule figlie che derivano dalla divisione schizogonica restino infette (Carrington e coll., 1995). Il parassita e la cellula ospite si dividono contemporaneamente e la sintesi del DNA dello schizonte si ha quando la cellula ospite entra in mitosi; a tutto ciò segue rapidamente la



divisione, quando la cellula ospite è in metafase (Irvin e coll., 1982).

L'esatto meccanismo attraverso il quale *Theileria* spp. induce la proliferazione non è conosciuto, ma è possibile che *T. annulata* e *T. parva* impieghino meccanismi differenti, fra cui l'alterazione di alcune chinasi (Eichhorn e coll., 1994, Fich e coll., 1998, Galley e coll., 1997, ole-MoiYoi e coll., 1989; 1993) e la distruzione o l'induzione di vari attivatori della trascrittasi (Botteron e coll., 1998, Palmer e coll., 1997).

Il ritmo di proliferazione è tale per cui le cellule infette duplicano ogni tre giorni. Circa 12 giorni dopo l'inizio dell'infezione, dai macroschizonti si vengono a formare i microschizonti, i quali, in circa 24 ore, producono i merozoiti; questi penetrano poi all'interno dei globuli rossi, nei quali si dividono per scissione binaria. Il ciclo si completa con l'assunzione degli eritrociti parassitati da una zecca trifasica grazie al pasto di sangue (Capelli e coll., 2010).

Il periodo d'incubazione dopo la puntura della zecca è di 8-24 giorni per *T. parva*, mentre è di circa 15 giorni per *T. annulata*.

Sia per *T. parva* che per *T. annulata* è lo stadio linfocitario che determina le diverse manifestazioni di malattia; i merozoiti vengono prodotti all'interno dei linfociti infetti e da questi fuoriescono rompendoli (Shaw e Tinley, 1992). I merozoiti invadono poi i globuli rossi similmente a come è avvenuto per i linfociti e, come per gli schizonti intra-linfocitici, anche i merozoiti sono liberi nel citoplasma. C'è una scarsa moltiplicazione di *T. parva* all'interno dei globuli rossi, invece la moltiplicazione che si ha nello stadio intraeritrocitario di *T. annulata* contribuisce alla patologia della theileriosi tropicale. Per altre specie di *Theileria* spp., ed in particolare quelle che non determinano trasformazione dei linfociti come *T. mutans*, *T. buffeli* e *T. sergenti*, i livelli di merozoiti che si vengono a formare negli eritrociti sono elevati, determinando così anemia di tipo emolitico (Bishop e coll., 2004).

Un aspetto particolarmente interessante legato a questa infezione è quindi il processo linfoproliferativo, in quanto questo sistema fornisce un unico e potenzialmente potente strumento per esaminare e possibilmente chiarire i meccanismi del controllo del ciclo delle cellule nei linfociti. Le due specie maggiormente utilizzate per tali studi sono *T. parva* che porta soprattutto alla proliferazione delle cellule T, e la strettamente correlata *T. annulata* che infetta primariamente le cellule B e i macrofagi (Spooner e coll., 1989). Entrambe le specie causano gravi malattie linfoproliferative e le cellule infette possono proliferare indefinitivamente nelle colture cellulari. Queste cellule trasformate hanno diverse caratteristiche salienti, tra cui il cambio, sulla superficie, degli epitopi per gli anticorpi monoclonali (Naessens e coll., 1985), il pleomorfismo e il breve tempo di generazione (16-25 ore in vitro) (Steuber e coll., 1986). Inoltre, quando i linfociti infetti sono iniettati in topi atimici (Irvin e coll., 1975) o SCID (con immunodeficienza multipla severa) (Fell e coll., 1990), essi infiltrano i tessuti formando masse metastatiche simil-tumoriali. La trasformazione è comunque reversibile in seguito a trattamento farmacologico perfino dopo molti anni in coltura (McHardy, 1984; Hudson e coll., 1985; Rintelen e coll., 1990).

## 2.4 ECOLOGIA

*Babesia* spp. è uno dei parassiti del sangue maggiormente diffuso nel mondo, in relazione al numero e alla distribuzione di specie ospiti, seconda solo ai tripanosomi (Telford III e coll., 1993).

Come già detto, sia *Babesia* spp. che *Theileria* spp. hanno generalmente due classi di ospiti, uno invertebrato e uno vertebrato ed il mantenimento di *Babesia* spp. dipende da entrambi gli ospiti: le zecche vettrici si cibano sugli ospiti vertebrati serbatoio che sono in grado di mantenere il parassita allo stato infettante per la zecca, viceversa la zecca è in grado di mantenerlo nell'ambiente e di trasmetterlo alla prole. L'ecologia di questi due generi di piroplasmi è strettamente correlata con quella delle zecche vettrici, eccezion fatta per la già citata *B. gibsoni*.

### 2.4.1 BABESIA SPP.

Dai dati riscontrati in letteratura, si nota che solo le zecche *Ixodidae* sono state identificate come vettrici di *Babesia* spp. e *Theileria* spp., ad eccezione di un caso dove *Ornithodoros erraticus* (zecca *Argasidae*) è stato indicato come reservoir di *B. meri* (Gunders, 1977).

Per quanto riguarda il rapporto parassita-zecca vettrice, si è visto che alcune specie come *B. bigemina* e *Theileria equi* (*Babesia equi*), possono infettare più di un genere di zecche (Kakoma e coll., 1993; Shortt, 1962), mentre *B. microti* può infettare solo zecche del genere *Ixodes* (Telford III e coll., 1993). Diverse zecche possono essere vettrici di più di una specie di *Babesia*. Per esempio, *Ixodes dammini* ospita, prevalentemente, ma non esclusivamente *B. microti* (Piesman e coll., 1986), ma nel suo stadio ninfa (Piesman e coll., 1982; Spielman e coll., 1981) può albergare anche *B. odocoilei* (Armstrong e coll., 1998). Non è ancora noto se le zecche possano ospitare allo stesso tempo più di una specie di *Babesia* e nemmeno se ne possano trasmettere più di una contemporaneamente.

***B. microti*:** l'ecologia e il ciclo biologico di *B. microti* e la sua interazione con *I. dammini*, in passato conosciuta anche come *Ixodes scapularis* (Spielman e coll., 1979), la rendono la più conosciuta fra le specie di *Babesia* (Telford III e coll., 1993). Lo stadio ninfa di *I. dammini* e la sua interazione con *Peromyscus leucopus* (topo dalle zampe bianche) è essenziale per il mantenimento di *B. microti* negli USA. Osservazioni in campo hanno stimato che più del 40% dei topi siano infetti (Spielman e coll., 1981; Piesman e coll., 1987a; Hofmeister e coll., 1998), e in un altro studio sono risultati infetti addirittura il 60% degli stessi (Etkind e coll., 1980). Allo stadio adulto *I. dammini* si ciba prevalentemente sul cervo della Virginia (*Odocoileus virginianus*), che non funge da reservoir per *B. microti*, bensì per *B. odocoilei* (Piesman e coll., 1979). Le uova schiudono in estate (tardo luglio) e le larve si cibano prevalentemente sui topi nel periodo agosto e settembre. Questo è il periodo nel quale le zecche possono acquisire *Babesia* spp. Queste larve infette superano l'inverno e mutano a ninfe in primavera (Piesman e coll., 1987a). Si pensa che approssimativamente il 40% delle ninfe di zecche in alcune aree (es. isola Nantucket) dove la babesiosi è endemica, siano infette (Piesman e coll., 1987a). Le

ninfe si cibano sugli ospiti, prevalentemente *P. leucopus* nel nord-est degli Stati Uniti (Healy e coll., 1976, Spielman e coll., 1981) e su lucertole nel sud-est degli Stati Uniti (Spielman e coll., 1985) da maggio fino a luglio. Le ninfe che si sono cibate mutano in adulti in autunno, completando il ciclo. Si pensa che le lucertole siano un serbatoio inadeguato e non siano in grado di mantenere *B. microti* come agente infettante (Spielman e coll., 1985), mentre i topi possono mantenere tali organismi. Sono stati segnalati solo due casi umani in Europa ascritti a *B. microti* (Gorenflot e coll., 1998; Humiczewska e coll., 1997). Questo è probabilmente dovuto alla limitata o assente interazione in quest'area tra la zecca ospite di *B. microti* e l'uomo (Telford III e Spielman, 1998). In Europa, infatti, le zecche specifiche dei topi reservoir per *B. microti*, appartengono alla specie *Ixodes trianguliceps* (Telford III e coll., 1993) e non si cibano sull'uomo.

***B. divergens*:** gli ospiti vertebrati sono i bovini, mentre la zecca responsabile della trasmissione all'uomo è *Ixodes ricinus* (Gorenflot e coll., 1998; Telford III e coll., 1998). Il ciclo di vita di *I. ricinus* richiede 3 anni: larva al primo anno, ninfa al secondo anno e adulto al terzo. Un'osservazione importante è che la maggiore incidenza delle infezioni da *B. divergens* nei bovini avviene quando le temperature ambientali sono elevate, presumibilmente quando le zecche sono più attive. Inoltre, molti casi umani sono stati riportati in persone con elevati contatti con i bovini (Clarke e coll., 1989). *I. ricinus* è anche il vettore della malattia di Lyme in Europa.

***B. major*:** la presenza di questa *Babesia* in Svizzera è stata confermata grazie all'estrazione del DNA da zecche *I. ricinus* (Brossard e Aeschlimann, 1975), ma anche *H. punctata* è ritenuta un suo vettore (Hilpertshauser e coll., 2006).

**WA1:** la zecca vettrice di questa specie recentemente scoperta non è conosciuta, ma ci sono però diversi candidati: le zecche *Dermacentor variabilis*, *Ornithodoros coriaceus* e *Ixodes pacificus* sono infatti presenti nell'area dove è avvenuto il caso attribuito a WA1 (Telford III e Spielman, 1998). Anche l'ospite vertebrato serbatoio di WA1 non è conosciuta. Questo ceppo è maggiormente correlato a *Babesia gibsoni*, patogena nel cane, ma WA1 non sembra infettare il cane. Essa può infettare i roditori e si è visto che, a seconda dello stato di salute dei soggetti utilizzati per lo studio, può essere per loro fatale (Moro e coll., 1998).

***B. divergens-like*:** negli Stati Uniti, l'ospite serbatoio per questi parassiti isolati nel Missouri (MO1) e nel Kentucky si presuppone possa essere, grazie ad un lavoro di Goethert e Telford (2003) svolto a Nantucket, qualche specie di 'cottontail rabbit'. Il vettore non è invece conosciuto, ma probabilmente *Ixodes dentatus* mantiene l'infezione nella popolazione di conigli di Nantucket.

***Babesia* EU-1:** studi effettuati da Duh e coll. (2001; 2005a) e da Bonnet e coll. (2007), supportano fortemente l'ipotesi che l'ospite vertebrato siano i cervidi, mentre il vettore sia *I. ricinus*. Anche uno studio svolto nel Sud della Svizzera da Hilpertshauser e coll. (2006) concorre a validare quest'ipotesi: 3 delle 294 zecche esaminate nel loro lavoro infatti, presentano positività per EU 1 (Casati, 2005).

In Italia sono state segnalate diverse specie di *Babesia* quali: *B. bigemina*, *B.*

*divergens*, *B. bovis*, *B. major*, *B. equi*, *B. caballi*, *B. canis*, *B. gibsoni*, *B. ovis*, *B. EU1*. La presenza di queste specie è correlata alla diffusione sul territorio nazionale di importanti vettori di questi agenti quali *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus sanguineus* (tipico parassita del cane), *R. bursa* e *R. (Boophilus) annulatus*.

Prendendo in considerazione invece gli ospiti vertebrati, si è già detto visto che proprio sulla base dell'ospite le specie identificate di *Babesia* erano più di 100 (Levine, 1971; Telford III e coll., 1993)

Questo piroplasma può infettare molti mammiferi, soprattutto dell'ordine *Rodentia*, e anche diverse specie aviari (Levine, 1971; Kakoma e coll., 1993; Telford III e coll., 1993).

La specie-specificità varia in funzione della specie di *Babesia*: ad esempio 2 specie agenti di zoonosi, *B. microti* e *B. divergens*, hanno un range ampio che comprende piccoli roditori (Spielman, 1976; Brandt e coll., 1977), primati umani e non umani per la prima (Moore e Kuntz, 1981; Ruebush e coll., 1981a,b), roditori, bovini, cervidi (Langton e coll., 2003) e uomo per la seconda (Mahoney, 1977; Murphy e coll., 1986; Clarke e coll., 1989).

Altre specie di piroplasmi descritte negli animali hanno una maggiore specificità d'ospite ad esempio le specie che colpiscono i cavalli (*B. caballi* e *T. equi*), quelle che si riscontrano nei cani (*B. canis*, *B. gibsoni* e *B. vogeli*) (Telford III e coll., 1993), o quelle specifiche per il suino *B. trautmanni* e *B. perroncitoi* (Knuth e duToit, 1922). Sono state evidenziate differenti manifestazioni di malattie derivanti dalla trasmissione di una specie di *Babesia* (es. *B. microti*) che è comune in una specie vertebrata selvatica (es. *P. leucopus*) a un ospite vertebrato scarsamente adattato (es. uomo). Come ospite naturale di *B. microti* vi sono numerosi topi bianchi (*P. leucopus*) che nelle aree enzootiche di babesiosi sono parassitemici; tuttavia, non è inusuale riscontrare che meno dello 0,1% degli eritrociti di tali ospiti siano infetti (Etkind e coll., 1980; Spielman e coll., 1981); sembra inoltre che i topi bianchi rimangano parassitemici per tutta la vita (Spielman e coll., 1981). Al contrario, i criceti e i topi da laboratorio possono sviluppare alta parassitemia, spesso del 40-50% (Lykins e coll., 1975; Benach e coll., 1978; Harvey e coll., 1988).

Per quanto riguarda *B. divergens*, Zintl e coll. (2003) hanno supposto che il serbatoio possano essere bovini con un'infezione subclinica; di conseguenza i movimenti del bestiame possono influenzare la diffusione geografica.

#### 2.4.2 THEILERIA SPP.

Anche per *Theileria* spp. è importante ricordare quanto la presenza di entrambi gli ospiti, vertebrato ed invertebrato, sia fondamentale per il completamento del ciclo vitale.

I principali vettori di *Theileria parva* sono: *Rhipicephalus appendiculatus*, *R. zembeziensis* e *R. duttoni* (Bishop e coll., 2004); *T. annulata* è invece trasmessa da zecche appartenenti al genere *Hyalomma*: *H. detritum* in Nord Africa, *H. detritum* e *H. excavatum* nei Paesi dell'Est, *H. truncatum* in alcune zone dell'Africa, *H. dromedarii* in Asia centrale, *H. excavatum*, *H. turanicum* e *H. marginatum* in Asia minore, *H. marginatum* in India e *H. longicornis* in Siberia ed in Estremo Oriente (Capelli e coll., 2010). Come per la babesiosi, anche in questo caso la presenza di

*Theileria* spp. è strettamente legata alla zecca vettrice ma, in questo caso, non essendoci la trasmissione transovarica, il serbatoio è solamente l'ospite vertebrato.

## 2.5 EPIDEMIOLOGIA

### 2.5.1 BABESIA SPP

Come già detto, il ciclo del parassita è strettamente legato sia a quello dell'ospite vertebrato, sia a quello della zecca, di conseguenza la comparsa dei casi di babesiosi o di teileriosi dipenderà anche da qualsiasi fattore in grado di incidere su questi due aspetti.

A dimostrazione di ciò che è stato appena detto, in generale, la babesiosi ha un tipico andamento stagionale, con un picco primaverile fra aprile e giugno ed uno autunnale da agosto ad ottobre. Inizialmente si credette che la temperatura atmosferica fosse un fattore chiave per lo sviluppo della babesiosi, poiché fu riscontrata una forte correlazione tra la temperatura e l'incidenza della malattia (Donnelly e McKellar, 1970). In un secondo momento si è visto però come la temperatura, pur avendo un ruolo fondamentale nel determinare i primi e gli ultimi casi d'infezione della stagione, abbia invece un effetto minimo una volta superata la temperatura minima per l'attivazione delle zecche (Gray, 1980). In primavera, alla temperatura di 7-10 °C, le ninfe e le zecche adulte entrano in attività e i primi casi di babesiosi si osservano circa dopo due settimane (Donnelly, 1973); le zecche che si alimentano in primavera potrebbero contribuire al manifestarsi del picco autunnale, nonostante questo sia più probabilmente attribuibile a ninfe e ad adulti alimentatisi nell'autunno precedente ed entrati poi in diapausa (Zintl e coll., 2002). Inoltre, data la possibilità di trasmissione sia transtadiale che transovarica di *Babesia* spp. all'interno della zecca, sembra ormai accertato che l'ospite vertebrato non sia essenziale per mantenere il parassita all'interno di una popolazione di zecche, almeno per brevi periodi di tempo.

Donnelly e Peirce (1975) hanno dimostrato che *Babesia divergens* persiste in *Ixodes ricinus* fino alla seconda generazione larvale, anche se gli stadi intermedi dell'artropode non si sono alimentati su animali infetti. Di conseguenza il parassita si può mantenere fino a quattro anni all'interno di una popolazione di zecche, anche in assenza di ospiti recettivi, poiché *I. ricinus* ha bisogno di circa tre anni per completare una generazione (Joyner e Donnelly, 1979). Le zecche, quindi, sono indubbiamente il serbatoio principale nel mantenimento in natura di *Babesia* spp. (Gray e Murphy, 1985).

Nelle zone endemiche, comunque, la morbilità è molto bassa in seguito alla sufficiente copertura immunitaria dell'ospite ottenuta grazie a contatti ripetuti col parassita, di conseguenza la malattia si manifesta solo se si rompe questo equilibrio ospite-parassita (per fattori relativi all'ospite, all'ambiente o al parassita) o se in tali zone entrano animali recettivi provenienti da aree indenni. In questi casi, il manifestarsi della malattia è di elevata importanza, vista la conseguente alta mortalità (Navarrete e coll., 1999).

Parlando specificatamente dei fattori in grado di alterare l'equilibrio ospite-parassita, li possiamo classificare in:

**Fattori relativi al parassita:** questi fattori sono soprattutto legati a specificità e virulenza della specie di *Babesia* coinvolta; ad esempio *B. divergens* nel bovino, è molto più patogena rispetto a *B. major*. Altri aspetti importanti rivestono anche il ceppo ed il singolo parassita, quale possibile portatore di mutazioni significative per la patogenicità (Navarrete e coll., 1999)

**Fattori relativi all'ospite:** le diverse razze hanno diversa sensibilità a *Babesia*; ad esempio le pecore Romanowsky sono più suscettibili a *B. ovis* di quelle di razza Merinos (Li, 1957); allo stesso modo si è visto che i bovini della specie *Bos indicus* sono meno sensibili a *B. divergens* di quelli della specie *Bos taurus* (Francis, 1966) e che, fra questi ultimi, le razze Jersey (Ranatunga e Wanduragala, 1974) e Charollaise (Lohr, 1969) sono maggiormente recettive.

Anche l'età può influire sulla sensibilità a *Babesia* spp.; per alcune specie del parassita in questione la sensibilità diminuisce all'aumentare dell'età; ad esempio i cuccioli di cane sono molto sensibili a *B. gibsoni* e *B. canis* (Botros e coll., 1975) e ugualmente i puledri a *B. equi* (Erbsloh, 1975). Viceversa, nei bovini la sensibilità a *Babesia* spp. aumenta con l'età. Questo è vero soprattutto per le aree endemiche, in cui i vitelli sono protetti dagli anticorpi colostrali (Hall, 1960).

Il sesso dell'ospite è un fattore poco studiato ma secondo un studio di Goble (1966), i topi maschi risultavano più sensibili delle femmine a *B. rodhaini*; lo stesso vide Curasson (1943) nei bovini per *B. divergens*.

Anche l'età degli eritrociti sembra essere un fattore importante; si è visto, infatti, da studi effettuati da Cox (1973), che varie specie di *Babesia* invadono preferibilmente eritrociti maturi e in caso di sovrainfezioni o quadri anemici, in cui la percentuale di eritrociti maturi tende ad essere deficitaria a favore di cellule più giovani, la sensibilità a *Babesia* spp. diminuisce notevolmente. La malaria ad esempio induce una forma di anemia emolitica di tipo rigenerativo, con notevole aumento dei reticolociti, precursori dei globuli rossi; per questo motivo una sovrainfezione babesiosica non si svilupperebbe in quanto verrebbero a mancare le sue cellule bersaglio.

**Fattori relativi all'ambiente:** l'ambiente interviene soprattutto come fattore condizionante la presenza del vettore: infatti, nelle zone endemiche dove le zecche sono numerose, l'immunità dell'ospite è mantenuta a livelli efficaci dalle continue reinfezioni ed i casi di malattia clinicamente manifesta sono rari. Al contrario, nelle aree dove le zecche sono poche o limitate a zone molto ristrette, la popolazione animale è praticamente priva di immunità. In questi casi, quando si verifica un improvviso aumento della popolazione di zecche dovuto a cambiamenti climatici, l'incidenza di babesiosi conclamata può aumentare in modo significativo. Tale situazione è nota come "instabilità enzootica" (Urquhart e coll., 1998).

### 2.5.2 THEILERIA SPP.

Analogamente a *Babesia* spp., la theileriosi ha andamento stagionale, in quanto strettamente dipendente dal suo ospite e dal suo vettore. Anche in questa patologia quindi, la zecca svolge un ruolo fondamentale: questa è maggiormente attiva dopo le piogge e di conseguenza i focolai possono presentarsi stagionalmente o, se le piogge sono costanti, anche continuativamente. In zone in cui la presenza delle zecche è scarsa, l'infezione è poco probabile e di conseguenza, a causa degli scarsi

contatti ospite-parassita, i bovini presenti mostravano un'immunità piuttosto bassa. Se in queste aree però, si hanno precipitazioni prolungate, l'habitat diventa favorevole alla crescita e alla diffusione delle zecche, e questo, unito alla scarsa immunità degli animali, determina l'insorgenza di gravi focolai di theileriosi. Come per la babesiosi, gravi casi (con mortalità indipendentemente dall'età e dalla razza) si possono avere anche in conseguenza all'introduzione di animali recettivi senza precauzioni idonee, in un'area endemica. In aree endemiche, i bovini adulti presentano generalmente una buona resistenza ma si possono verificare forme gravi nei giovani, anche se di solito non portano alla morte. I soggetti resistenti hanno un ruolo fondamentale, in quanto possono rimanere portatori di *Theileria* e diventare reservoir per le zecche (Capelli e coll., 2010). Altro fattore da ricordare è che i bovini possono essere infestati da diverse specie di zecche ed inoltre è stato accertato che una stessa zecca può trasmettere più di una specie di *Theileria* spp. (Bishop e coll., 2004). Un esempio è dato da *T. parva* e *T. taurotrago*, gli sporozoiti di queste due specie sono stati ritrovati insieme nelle ghiandole salivari della zecca *R. appendiculatus* (Bishop e coll., 1994). Importante è inoltre ricordare che molti bovini in Africa sono infetti da più di una specie di *Theileria* spp. e la situazione epidemiologica è particolarmente complicata nei bovini dell'Africa orientale, i quali possono essere infetti con anche cinque specie diverse nello stesso momento (Norval e coll., 1992).

Infine, alcune complicazioni si possono avere per la presenza di particolari ceppi. Ad esempio in alcune zone dell'Africa centrale ed orientale, in cui vi è la convivenza di popolazioni di bovini e di bufali selvatici, si ha la circolazione di un particolare ceppo: *T. parva lawrencei*; molti bufali sono portatori di questo ceppo, che è però mortale per i bovini; inoltre il vettore, che è lo stesso di *T. parva*, può resistere nell'ambiente fino circa a due anni, aumentando così la probabilità di trasmissione.

Per quanto riguarda *T. annulata*, come per la East Coast Fever, gli animali introdotti nelle aree endemiche, in particolare le razze europee, sono molto recettivi, anche se la malattia in questo caso non è sempre fatale; la mortalità in questi però può arrivare al 70% (Capelli e coll., 2010).

## 2.6 PATOGENESI

### 2.6.1 BABESIA SPP.

In seguito all'infezione nel vertebrato, *Babesia* spp., si moltiplica negli eritrociti, e a questo aspetto è strettamente correlata la gravità dei sintomi rilevabili (Telford III e coll., 1993); dal punto di vista sintomatologico, inizialmente si ha però una fase clinicamente silente che si protrae per circa due settimane; in questo periodo i parassiti possono essere reperiti anche in gran numero nei globuli rossi senza il manifestarsi di alcun segno clinico (Urquhart e coll., 1998).

Una volta penetrata nell'organismo ospite *Babesia* spp. esercita la sua azione patogenetica tramite tre meccanismi:

- azione meccanica con rottura degli eritrociti
- azione tossica attraverso la produzione e l'escrezione da parte dei merozoiti di sostanze tossiche

- competizione con l'organismo ospite nell'utilizzo di determinate sostanze quali ad esempio l'emoglobina

Queste tre vie portano tutte allo stesso risultato e cioè ad una mancata ossigenazione di tessuti ed organi e loro conseguente ipofunzionalità (Navarrete e coll., 1999).

Nelle infezioni acute gli eritrociti vengono rapidamente distrutti e l'ematocrito scende prima ancora che i parassiti siano evidenziabili nel sangue periferico (Todorovic e coll., 1976).

La maggior parte dei dati in nostro possesso è stata ottenuta tramite inoculazione di *B. microti* presente in sangue umano infetto, in criceti o in topi di laboratorio; spesso il 50-70% degli eritrociti può essere parassitato (Cullen e Levine, 1987) dopo un tempo di incubazione variabile di 1-2 settimane a seguito di inoculazione intraperitoneale. Emolisi intra- ed extravascolare originano man mano che la parassitemia procede, con conseguente grave anemia ed ematocrito che può raggiungere valori del 20% (Lykins e coll., 1975).

La distruzione degli eritrociti è diretta conseguenza della localizzazione intracellulare di *Babesia* spp.; è dimostrato infatti che i globuli rossi infetti sono molto più fragili e che anche quelli non infetti risultano a loro volta più deboli. Quindi, in corso di babesiosi, l'emolisi intravasale è piuttosto ingente (Wright, 1973a).

La cospicua perdita di globuli rossi è dovuta, oltre che all'emolisi, anche alla fagocitosi degli eritrociti infetti da parte dei macrofagi circolanti, motivo per cui la milza gioca un ruolo fondamentale nelle infezioni da *Babesia* spp.. Tale organo infatti, in quanto densamente popolato da macrofagi, è responsabile della fagocitosi degli eritrociti infetti e dei parassiti liberi ed è, inoltre, sede della cosiddetta "memoria" immunitaria, soprattutto per quanto riguarda i linfociti T (Curnow, 1973). Si spiega così la ragione per cui la splenectomia è uno dei fattori predisponenti all'infezione da *Babesia* spp. nell'uomo (Barnett, 1965).

Immediatamente dopo la crisi emolitica, inoltre, si sviluppano breve linfocitosi e monocitosi che esitano in leucocitosi diffusa (Purnell e coll., 1977).

La presenza del parassita in circolo porta anche all'attivazione della pre-callicreina e, quindi, della callicreina. Tale sostanza, normalmente presente nel sangue, determina un aumento della permeabilità vasale con conseguente edema.

A questo quadro si sovrappongono anche turbe della coagulazione che portano, alla fine, alla coagulazione intravasale disseminata (CID), in quanto, in seguito alla produzione di proteasi ed esterasi da parte dei merozoiti, aumenta la quantità di fibrinogeno e di fibrina con conseguente formazione di microtrombi disseminati, favorita dall'azione della callicreina che, attraverso la maggiore permeabilità vasale, determina anche la perdita di fattori di degradazione del fibrinogeno (PDF) (Navarrete e coll., 1999).

Alcune specie di *Babesia* (es. *B. bovis* e *B. canis*) producono anche alcune sostanze enzimatiche con spiccato tropismo per il sistema nervoso centrale, a livello del quale esplicano la loro azione tossica determinando, in alcuni casi, la comparsa di sintomatologia nervosa (Boreham e coll., 1976). Il danno a livello di sistema nervoso centrale sembra dovuto principalmente all'impaccamento degli eritrociti nei capillari cerebrali causato, appunto, da un'enzima del parassita (Wright e coll., 1973b).

Durante l'infezione da *Babesia* spp. avviene, inoltre, la formazione di immunocomplessi che vanno a depositarsi a livello di endotelio vasale causando



ulteriori danni, soprattutto renali, come ad esempio la glomerulonefrite (Zintl e coll., 2003).

Tutti questi meccanismi portano ad un grave stato di anossia, o almeno ipossia, di vari tessuti ed organi e possono esitare nello shock.

Se il sistema immunitario risulta efficace, l'infezione viene rapidamente arginata e non si manifesta clinicamente in quanto, una volta eliminati i parassiti, si ha un considerevole aumento dell'eritropoiesi, evidenziato dall'aumentata presenza in circolo di reticolociti nucleati. Anche in caso di malattia conclamata si attiva l'eritropoiesi come meccanismo compensatorio, ma non è sufficiente a far fronte all'ingente emolisi (Purnell e coll., 1977).

Se, comunque, la risposta immunitaria non è efficiente la morte sopravviene solitamente per collasso cardio-circolatorio o per insufficienza epatica o renale (Collins e coll., 1970b).

L'azione patogena rimane strettamente dipendente sia dalla specie di *Babesia* infettante che dalla sensibilità e dall'efficacia della risposta immunitaria dell'ospite.

La risposta immunitaria vede coinvolte la componente umorale, quella cellulo-mediata ed anche quella aspecifica.

*Risposta umorale:* la sua importanza è limitata in quanto l'azione anticorpale è efficace solamente sulle forme libere, infatti subito dopo l'inoculazione del parassita da parte della zecca, gli sporozoi sono liberi nel plasma per un breve periodo di tempo ed in questo momento le immunoglobuline G (IgG) possono prevenire l'infezione legandosi agli sporozoi e neutralizzandoli prima che essi invadano le cellule bersaglio, mentre se invece riescono a penetrare all'interno degli eritrociti, la parassitemia aumenta e si potrà manifestare la malattia. Dovranno allora entrare in gioco i fattori immunitari aspecifici (Homer e coll., 2000). Tutto ciò è supportato anche dal fatto che l'inoculazione di siero immune in topi immunodeficienti affetti da *B. microti* non risolve la situazione (Matsubara e coll., 1993). Altre osservazioni suggeriscono che *Babesia* spp. sia in grado di sovvertire e manipolare la risposta umorale a proprio vantaggio; è stato infatti dimostrato che una proteina di *B. bigemina* espressa sulla superficie dell'eritrocita infetto è coinvolta nel legame con le IgM e si suppone che tale legame sia in qualche modo favorevole alla crescita ed alla sopravvivenza del parassita (Echaide e coll., 1998). A sostenere quest'ipotesi contribuisce anche il fatto che topi IgM deficienti sono inaspettatamente resistenti all'infezione da *B. microti* (Rosenberg e Evans, 1979). Un simile meccanismo sembra esistere anche in relazione ai componenti del complemento, infatti in uno studio in cui il complemento veniva utilizzato per promuovere la fagocitosi macrofagica dei merozoiti di *B. rodhaini*, l'inaspettato risultato fu che la presenza del complemento inibiva la fagocitosi del patogeno stesso (Parrodi e coll., 1991).

*Risposta cellulo-mediata:* Il ruolo importante delle cellule T è suggerito dalla persistente parassitemia che si riscontra nel caso in cui soggetti affetti da infezione siano privi del timo, diversamente da quanto accade a soggetti dello stesso gruppo, ma con timo regolarmente attivo (Clark e Allison, 1974). Studi condotti su animali atimici hanno concluso che i linfociti T sono essenziali nella resistenza alla babesiosi e che tali cellule mediano anche processi che avvengono durante la risoluzione dell'infezione (Ruebush e coll., 1980).

*Risposta non specifica:* anche fattori immunitari non specifici (immunità innata) sono coinvolti nella protezione contro l'infezione da *Babesia* spp., in particolare macrofagi e cellule Natural Killer (NK), sembra che essi intervengano nella primissima fase

dell'infezione (Solomon e coll., 1985). Sia nel caso delle cellule NK che dei macrofagi sembra essere fondamentale la produzione di mediatori solubili in grado di combattere il parassita, in particolare, è probabile che la produzione di ossido nitrico (Rosenblatt-Bin e coll., 1996) e di TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) (Clark, 1978) da parte dei macrofagi inibisca efficacemente la crescita parassitaria. In questa fase iniziale della malattia la milza ha la massima capacità di trattenere e fagocitare gli eritrociti infetti o quelli che presentano una qualsiasi alterazione. La presenza di quest'organo è fondamentale nel controllo dell'infezione (Homer e coll., 2000). Studi condotti sui cani infettati sperimentalmente hanno evidenziato che i soggetti splenectomizzati sviluppano più rapidamente la parassitemia e la forma clinica (Vercammen e coll., 1995).

Ci sono anche altri fattori non ben conosciuti che sono in grado di alterare la sensibilità degli ospiti vertebrati alle infezioni da piroplasmi, come ad esempio la presenza primaria di *eperythrozoan* che potrebbe antagonizzare l'infezione, o anche altre sostanze e organismi che potrebbero difendere i topi da *B. microti* in modo aspecifico (BCG, glucani, zymosan, *Salmonella* spp., *Listeria* spp.) (Clark, 1978). Infine una dieta povera di proteine, sempre nei topi, sembra poter incrementare il periodo di prepatenza e ridurre il picco della parassitemia (Tetzlaff e coll., 1988).

### 2.6.2 THEILERIA SPP.

Come accennato in precedenza, nell'ambito della theileriosi le due malattie di maggior impatto economico sono la East Coast Fever sostenuta da *T. parva* e la Theileriosi tropicale sostenuta da *T. annulata*. Esse determinano gravi perdite economiche in seguito ad un calo della produttività, fino anche alla morte degli animali.

Per quanto riguarda *T. parva*, la malattia si presenta con caratteristiche acute ed è fatale; si possono distinguere tre fasi patogenetiche, la prima delle quali rappresenta il periodo d'incubazione, durante il quale né il parassita, né le lesioni sono evidenziabili. Nella seconda fase, si ha marcata iperplasia ed aumento della popolazione di linfoblasti infetti; questi sono localizzati inizialmente a livello dei linfonodi tributari della zona in cui si è attaccata la zecca, mentre in seguito diffondono in tutto l'organismo (Capelli e coll., 2010).

Infine vi è la terza fase, caratterizzata da deplezione linfoide associata ad una massiva lisi linfocitaria (la cui causa è sconosciuta, anche se si pensa essere dovuta all'attivazione delle cellule 'natural killer' e dei macrofagi) e da depressione della leucopoiesi.

Ognuna di queste tre fasi dura circa una settimana.

Per *T. annulata*, la patogenesi è inizialmente simile a quella appena descritta per *T. parva*, ma nelle ultime fasi si osserva anche anemia emolitica ed ittero (Capelli e coll., 2010).

Una caratteristica unica sia per *T. parva* che per *T. annulata*, è la capacità dello schizonte di determinare la trasformazione delle cellule dell'ospite, senza l'integrazione del DNA del parassita in quello dell'ospite stesso; questo porta ad una continua proliferazione delle cellule di entrambi (Spooner e coll., 1989) e tutto ciò sta alla base del meccanismo patogenetico di queste due specie.

Il meccanismo che porta alla trasformazione delle cellule non è ancora stato del

tutto capito.

Per quanto riguarda le infezioni da *T. annulata*, questa invade prevalentemente i macrofagi dei bovini ed in misura minore anche i linfociti B (Glass e coll., 1989), ed al loro interno si differenzia nello stadio di schizonte multinucleato, il quale è responsabile della maggior parte del meccanismo patogenetico della malattia (Jensen e coll., 2009).

I macrofagi sono il prodotto terminale della differenziazione delle cellule della linea dei monociti e giocano un importante ruolo nella risposta immunitaria (Iwasaki e Akashi, 2007; Geissmann e coll., 2008; Serbina e coll., 2008); il parassita in questione determina un'inversione della direzione di sviluppo, portando ad uno stadio di indifferenziazione della cellula ed alterando così la risposta difensiva (Sager e coll., 1997). Quest'infezione altera sia il fenotipo che la funzione dei macrofagi dell'ospite (Glass e Jensen, 2007); per quanto riguarda le caratteristiche fenotipiche che vengono alterate, alcune di queste riguardano un'alterazione della regolazione dei markers macrofagici, CD14 e CD11b, assieme ad un aumento dell'espressione di alcuni geni, come ad esempio quelli del complesso maggiore di istocompatibilità bovino (BoLA) di classe2 (Glass e Spooner, 1990; Brown e coll., 1995; Sager e coll., 1997; Glass e Jensen, 2007). Tra le funzioni danneggiate invece, vi sono la fagocitosi, la produzione di ossido nitrico, di superossido e di citochine pro-infiammatorie (Sager e coll., 1997).

Il processo di differenziazione di monociti e macrofagi è controllato dall'attività coordinata di vari fattori di trascrizione (Hume e Himes, 2003; Friedman, 2007); i fattori coinvolti sono vari e fra essi vi sono anche due membri del 'muscoloaponeurotic fibrosarcoma oncogene transcription factor family' (c-MAF e MAFB) (Martinez e coll., 2006; Liu e coll., 2008). Il c-MAF oltre ad essere un fattore di trascrizione, è anche un oncogene (Kataoka e coll., 1993); esso svolge un importante ruolo nella proliferazione, differenziazione e sopravvivenza dei macrofagi (Jensen e coll., 2009). Lo studio svolto da Jensen e coll. (2009) ha evidenziato come l'espressione di c-MAF e MAFB e di tutti gli altri fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione della differenziazione di monociti/macrofagi sia soppressa dalla presenza di *T. annulata*. Questo va a supportare l'ipotesi che il parassita alteri lo stato di differenziazione della cellula ospite, e ciò è essenziale per la sua sopravvivenza e proliferazione. Tra tutti, MAFB è il principale target di soppressione per *T. annulata* (Jensen e coll., 2009).

La dinamica di soppressione di c-MAF e MAFB è diversa: la soppressione di MAFB si ha in infezioni da *T. annulata* già stabilite e non nei primi 3 giorni, a differenza del c-MAF che viene inibito negli stadi iniziali dell'infezione (Brossard e Wikel, 2004).

Il meccanismo con cui *T. annulata* induce la soppressione dei fattori di trascrizione non è nota; i geni dei fattori di trascrizione potrebbero essere il target delle proteine del parassita o la loro soppressione potrebbe derivare dalla regolazione della cascata di eventi nella via di differenziazione monociti/macrofagi (Jensen e coll., 2009).

Per quanto riguarda le infezioni da *T. parva*, non si sa ancora se i due fattori di trascrizione MAF vengono soppressi nei linfociti T e B.

Un altro meccanismo utilizzato da *Theileria* spp. agisce sulla proteina citoplasmatica p53; questa proteina è molto importante per la regolazione dei meccanismi di proliferazione e di apoptosi della cellula; la sua normale funzione è infatti quella di arrestare la divisione cellulare ed iniziare l'apoptosi nel caso di stress cellulari e

danneggiamento del DNA, per proteggere l'integrità del genoma (Haller e coll., 2010). Uno studio ha evidenziato il fatto che la presenza di schizonti di *Theileria* spp. all'interno delle cellule dell'ospite porta al sequestro citoplasmatico di questa proteina, con conseguente inibizione della via dell'apoptosi mediata dalla stessa e proliferazione delle cellule infette. Con la terapia a base di buparvaquone e la conseguente eliminazione del parassita dalle cellule, si ha la traslocazione della proteina p53 all'interno del nucleo favorendo la regolazione ed attivazione di proteine proapoptotiche ed inibendo quelle antiapoptotiche (Haller e coll., 2010). Si è visto infine che l'over-expression di c-MAF e MAFB determina un aumento dell'espressione della proteina p53 (Hegde e coll., 1999; Hale e coll., 2000).

## 2.7 SINTOMATOLOGIA

### 2.7.1 BABESIOSI NEGLI ANIMALI

**Cane:** Nel cane i cuccioli risultano più sensibili rispetto agli animali adulti (Soulsby, 1982).

La forma più frequente (più del 50% dei casi) è quella classica o acuta, che è caratterizzata da:

- modificazione del comportamento dell'animale con abbattimento, riluttanza al movimento e anoressia;
- ipertermia a comparsa improvvisa, elevata e persistente fino a 40°C per almeno 48 ore, associata a polipnea e tachicardia;
- sindrome emolitica che causa un'anemia spesso rigenerativa;
- valori di urea, creatinina, enzimi epatici e fosfatasi alcaline possono essere aumentati fino all'istaurarsi di una alterazione epatica e renale;
- urine con colorazione giallo-arancio per la costante presenza di bilirubina.

La forma cronica presenta varie e differenti manifestazioni cliniche fra cui un'anemia cronica che migliora senza trattamento.

Inoltre esistono delle forme atipiche con espressioni cliniche molto variabili, come ad esempio la forma locomotoria è caratterizzata da lombalgia e artrite, paresi, paralisi e atassia; nella forma cerebrale e oculare si osservano convulsioni, nistagmo, anisocoria, modificazioni del comportamento, coma; nelle forme renali si ha oliguria o anuria, emoglobinuria fino ad un'insufficienza renale.

**Equidi:** *B. caballi* ha un periodo d'incubazione di 1-3 settimane, dopo il quale determina:

- improvvisa ed importante ipertermia (41-42°C) che dura per 1-2 giorni per poi mantenersi abbastanza elevata per 8-10 giorni; questa forma di ipertermia si accompagna a sintomi generali quali anoressia, congestione delle mucose, polipnea e tachicardia;
- qualche giorno più tardi sopravviene un'anemia con subittero ed un'emoglobinuria più tardiva.

Come in tutte le forme di babesiosi si possono osservare delle forme atipiche con le manifestazioni a livello viscerale. Queste forme acute classiche portano in 8-10 giorni a morte in assenza di terapia adeguata.

Si può anche osservare una forma cronica che è caratterizzata da un'anemia permanente.

Anche nell'infezione con *Babesia equi* l'incubazione è di 12-15 giorni e la sintomatologia che determina è caratterizzata da:

- iniziale ipertermia meno marcata (39-40°C) ad andamento ciclico;
- anemia più grave, con linfocitosi;
- ittero costante, mentre l'emoglobinuria è più rara.

Non vi sono delle complicazioni respiratorie o nervose, ma molto spesso si osserva edema e petecchie delle mucose.

La malattia evolve in 8-10 giorni e la morte sopravviene in assenza di sintomatologia nel 40% dei casi. Le forme acutissime possono portare a morte in 48 ore; dal 30 al 90% degli eritrociti sono parassitati.

Può esistere anche una forma cronica con anemia moderata con subittero. Una parassitemia residua può quindi durare per diversi anni.

La diagnosi differenziale va fatta con l'ehrlichiosi monocitica equina, l'anemia infettiva e con l'insufficienza epatica (Zaugg, 1990).

**Bovini:** i segni clinici compaiono 2-3 settimane dopo l'attacco della zecca. Il periodo d'incubazione, comunque, varia dai 5 giorni alle 3 settimane in dipendenza dalla quantità di patogeno inoculato. I sintomi tipici sono:

- febbre, depressione, anoressia;
- inizialmente diarrea profusa, seguita poi da marcata costipazione;
- ittero, tachicardia, tachipnea ed emoglobinemia;
- marcata emoglobinuria e bilirubinuria conseguenti all'emolisi.

Negli animali gravidi, inoltre, si ha aborto.

L'anemia si può manifestare molto rapidamente, con distruzione del 75% o più degli eritrociti in pochi giorni. Si osservano spesso anche petecchie a carico delle mucose e della cute (Zaugg, 1990).

La babesiosi cerebrale, caratterizzata da ipereccitabilità, convulsioni, opistotono e coma può essere osservata in bovini affetti sia da *B. bigemina* che da *B. bovis*, ma specialmente da quest'ultima (Soulsby, 1982).

La morte è causata fondamentalmente dallo shock associato all'accumulo di tossine, al rilascio di sostanze vasoattive (callicreina) ed all'anossia anemica.

La maggior parte dei casi di babesiosi cerebrale è fatale anche se la mortalità è estremamente variabile in relazione alla specie di *Babesia* infettante.

I soggetti che sopravvivono alla fase acuta, in genere vanno incontro a guarigione ma divengono portatori asintomatici e possono rimanere resistenti alla malattia anche per 4 anni (Mahoney e coll., 1973); altri possono invece sviluppare la forma cronica, che può proseguire per settimane con un decorso irregolare e febbre intermittente. Anche questi soggetti possono soccombere alla malattia o morire in seguito ad infezioni secondarie contratte nel periodo di debilitazione.

Comunque, nelle forme croniche il numero di eritrociti parassitati diminuisce e la loro osservazione risulta difficoltosa (Soulsby, 1982).

Dal punto di vista sintomatologico, la babesiosi bovina può essere confusa con anaplasmosi, tripanosomiasi, theileriosi e leptospirosi ma l'osservazione del parassita in strisci di sangue è diagnostica. La forma cerebrale, invece, può essere confusa con la rabbia ed altre encefaliti (Zaugg, 1990).

Una resistenza verso *B. divergens* è stata vista nei vitelli (Brocklesby e coll., 1970).

**Suini:** il suino è infettato da *B. trautmanni* e da *B. perroncitoi*. La sintomatologia è molto simile per entrambe le specie e si presenta dopo 12-25 giorni dall'infezione con:

- febbre, anemia, emoglobinemia, ittero;
- emoglobinuria;
- edema delle parti declivi ed incoordinazione.

Nelle scrofe gravide si ha aborto e la mortalità può raggiungere il 50% (Soulsby, 1982). I suinetti di 2-4 mesi e gli adulti sono ugualmente sensibili. Nell'area dell'ex-URSS, inoltre, anche il cinghiale è risultato infetto e può fungere da serbatoio naturale per il parassita (Ershov, 1956).

### 2.7.2 THEILERIOSI

La sintomatologia dovuta all'infezione da *T. parva* e *T. annulata* è inizialmente simile.

In particolare, per quanto riguarda *T. parva*, negli animali recettivi si possono osservare due forme distinte, la prima delle quali è la forma classica, caratterizzata da:

- periodo d'incubazione di circa 7 giorni (9-25 giorni per *T.annulata*, con una media di 15 giorni), seguito da un aumento di volume dei linfonodi tributari della regione in cui si è attaccata la zecca (solitamente la regione parotidea) e piressia (40-41.7°C);
- dopo qualche giorno si ha un aumento generalizzato del volume dei linfonodi superficiali delle regioni auricolare, oculare e sottomandibolare;
- anoressia, calo della produzione lattea, interruzione della ruminazione, debolezza con aumento della frequenza cardiaca; possono essere presenti petecchie emorragiche vulvari e sottolinguali;
- emaciazione, dispnea;
- occasionalmente anche sintomi nervosi, dovuti alla presenza dei parassiti nei capillari cerebrali (ad esempio movimenti di circolo);
- eventualmente, nella fase terminale, gli animali possono presentare diarrea striata di sangue, decubito permanente, fino a morte in circa 3 settimane.

Ci sono però anche forme meno gravi, nelle quali gli unici sintomi sono rappresentati da una lieve piressia di 3-7 giorni, apatia ed aumento di volume dei linfonodi superficiali.

Per quanto riguarda *T. annulata*, come detto in precedenza la sintomatologia è simile, ma gli animali colpiti da questo parassita presentano anche edema delle palpebre e feci diarroiche contenenti sangue e muco; come per *T. parva* gli animali diventano emaciati e possono morire. Nella forma cronica si ha febbre intermittente, inappetenza, anemia emolitica ed ittero. La convalescenza in caso di guarigione, è particolarmente lunga.

Il complesso *Theileria buffeli/orientalis/sergenti* presenta una patogenicità minore rispetto alle specie già considerate, con sintomatologia caratterizzata occasionalmente da anemia, ittero e linfadenopatia.

Sintomi simili a *T. parva* e *T. annulata* si riscontrano anche nelle infezioni da *T. hirci*, una *Theileria* che parassita sia ovini che caprini ed altamente patogena per gli animali adulti, con mortalità dal 46 al 100%; un'altra specie presenta lo stesso spettro di ospiti, *T. ovis*, la quale determina invece un'infezione di media entità e clinicamente inapparente (Garippa e coll., 2010).

## 2.8 LESIONI ANATOMO-PATOLOGICHE

### 2.8.1 BABESIA SPP.

Nella maggior parte degli organi e dei tessuti si può osservare congestione, emorragia, trombosi ed edema, come conseguenza dell'azione della callicreina. Nel grasso sottocutaneo e nelle mucose compare una colorazione itterica, a volte profusa. Nelle mucose sono frequenti le emorragie, così come nel fegato, nella milza e nei linfonodi si osserva la presenza di depositi di emosiderina. È frequente anche l'aumento di volume di tutti gli organi, confermato a livello microscopico da ipertrofia e/o iperplasia cellulare. La presenza di liquido nelle cavità è costante e si osservano, soprattutto, ascite, idrotorace ed idropericardio.

Si osservano inoltre lesioni specifiche a carico di diversi organi ed apparati :

**Sistema Nervoso Centrale:** macroscopicamente si ha congestione e microscopicamente encefalite emorragica non purulenta, satellitosi, trombosi, neuronofagia e presenza di manicotti linfocitari perivascolari;

**Cuore:** emorragia, pericardite, miocardite, endocardite ed infarti, soprattutto a livello valvolare;

**Polmone:** emorragie ed edema alveolare;

**Fegato:** epatomegalia, epatite emorragica, colangite, infiltrazione linfocitaria, emorragie, degenerazione grassa ed aree necrotiche;

**Milza:** aspetto friabile, colorazione brunastra, splenomegalia, congestione, emorragie ed iperplasia;

**Rene:** glomerulonefrite, tubulonefrosi, nefrite interstiziale, emorragie, trombosi ed infarto renale;

**Apparato digerente:** gastrite emorragico-ulcerosa ed enterite, da desquamativa ad emorragica (Navarrete e coll., 1999).

### 2.8.2 THEILERIA SPP.

L'aspetto anatomico-patologico relativo all'infezione da *T. parva*, nella fase terminale della malattia, è caratterizzato principalmente da linfonodi che presentano aumento di volume, riduzione del contenuto cellulare ed iperemia di diverso grado. Altri rilievi sono:

- splenomegalia con polpa soffice e corpuscoli di Malpighi prominenti;
- fegato ipertrofico, friabile, giallo scuro e con degenerazione parenchimatosa; reni congesti o pallidi e possono presentare diversi infarti;
- cuore flaccido con petecchie su epicardio ed endocardio;
- polmoni spesso congesti ed edematosi;
- a volte: idrotorace, idropericardio, liquido sieroso in gran quantità nella capsula renale;
- spesso varie petecchie su: pleura parietale e viscerale, corteccia surrenale, vescica e mediastino;
- ulcere caratteristiche di 2-5 mm o più in: abomaso, intestino tenue e crasso;

- placche del Peyer aumentate di volume e contenuto intestinale giallastro;
- le meningi possono essere moderatamente congeste.

*T. annulata* determina un quadro molto simile a quello appena descritto: i linfonodi sono spesso, ma non sempre, aumentati di volume, la milza è ipertrofica ed i reni possono presentare infarti renali; anche in questo caso sono presenti le caratteristiche ulcere nell'apparato digerente ed i polmoni sono spesso edematosi.

Le lesioni che si possono rilevare invece in caso di infezione dal complesso *T. buffeli/sergenti/orientalis*, sono minori rispetto alle due specie sopracitate che presentano una patogenicità maggiore; negli animali morti è possibile ritrovare macroschizonti in impronte di milza e linfonodi (Capelli e coll., 2010).

## 2.9 ASPETTI ZONOSICI

Nel 1969 è stato segnalato il primo caso di babesiosi umana da *B. microti* in un individuo della costa orientale degli USA, con un caso fulminante nonostante il paziente non fosse splenectomizzato (Western e coll., 1970). La malattia era conosciuta come “febbre di Nantucket”, poiché tutti i casi erano avvenuti nell'isola di Nantucket, al largo delle coste del Massachusetts (Ruebush e coll., 1981b). Nei decenni successivi furono identificati più di 40 casi di “febbre di Nantucket”, rendendo così evidente la presenza di un focolaio endemico di *B. microti* lungo la costa orientale, particolarmente nelle isole Nantucket, Massachusetts, Long Island, New York (Spielman e coll., 1979; Benach e coll., 1978), ed in seguito foci endemiche sono stati identificati anche in aree di Connecticut, Wisconsin e Minnesota (Krause e coll., 1991; Steketee e coll., 1985; Pruthi e coll., 1995). Il range geografico di *B. microti* sembra inoltre estendersi verso sud, con singoli casi descritti nel New Jersey (Eskow e coll., 1999). Un review indica che oltre 300 casi umani di babesiosi dovuti a *B. microti* sono stati identificati negli USA, ma è possibile che molti casi siano subclinici e non diagnosticati (Krause e coll., 1998).

Dal 1968 in poi sono stati segnalati numerosi casi in California in soggetti splenectomizzati. I pazienti all'esame sierologico presentavano titoli elevati per *B. gibsoni* e bassi o assenti per *B. microti*. Anche nello stato di Washington sono stati riportati numerosi casi, tutti in soggetti non splenectomizzati e anche in questo caso con elevati titoli anticorpali verso *B. gibsoni*. Questo nuovo agente patogeno descritto è stato indicato come WA1 e i casi succitati della California sembrano strettamente correlati con questo agente.

La stretta relazione di WA1 con *B. gibsoni* (piroplasma del cane in California), indica che WA1 può non avere come reservoir i roditori. Dal 1992 al 1994 sono stati documentati tre casi in California, e nello stesso periodo altri isolati di *Babesia* spp. sono stati descritti nelle pecore (*Ovis canadensis*) (Goff e coll., 1993; Thomford e coll., 1993) nel cervo mulo (*Odocoileus hemionus*) (Thomford e coll., 1993) e nel daino (*Dama dama*) sempre in California. E' un'interessante coincidenza geografica il fatto che nei siti di esposizione dei casi umani con le popolazioni dei selvatici, da questi siano state isolate babesie morfologicamente simili e/o siano stati rilevati anticorpi verso *Babesia* (Kjemtrup e coll., 1995).

Dall'analisi filogenetica dell'intero 18S di tutti gli isolati dall'uomo e dai selvatici, come pure di altri piroplasmi, è stato dimostrato che gli isolati ottenuti dall'uomo e



dagli animali nell'ovest degli USA formano un unico cluster, separato da *B. microti*, *B. divergens* e *Theileria* spp. (Kjemtrup e coll., 2000).

Questi risultati mostrano che gli ungulati possono servire da reservoirs per le infezioni umane da WA1.

Le specie di zecche che possono fungere da vettori per WA1 e che possono pungere l'uomo sono: *Dermacentor variabilis*, *Dermacentor occidentalis* (solo in California) *Ixodes pacificus* e *Ixodes angustus* (Furman e coll., 1984; Lane, 1990; 1994).

La babesiosi umana in Europa viceversa non è molto frequente, e di solito riguarda soggetti splenectomizzati (Gorenflot e coll., 1998).

È del 1957 la documentazione di un caso umano di babesiosi, attribuito a *B. bovis*, in un allevatore splenectomizzato jugoslavo; questa è stata la prima dimostrazione del potenziale zoonotico di *Babesia* spp. Da quell'anno, circa 31 casi di babesiosi sono stati identificati in Europa, 23 dei quali sono stati causati da *B. divergens*. Questo piroplasma è un parassita dei bovini trasmesso da *Ixodes ricinus* con elevata importanza economica; è segnalato in Francia, Inghilterra, Irlanda, Spagna, Svezia, Svizzera, l'ex Jugoslavia e l'ex USSR (Denes e coll., 1999; Gorenflot e coll., 1998). In un caso isolato di un abitante delle Isole Canarie, dove *I. ricinus* non è presente, la strettamente correlata *Ixodes ventraloi*, è stata indicata come vettrice (Olmeda e coll., 1997). Geograficamente i casi umani coincidono con la presenza di popolazioni bovine infette e aree infestate da zecche *Ixodes ricinus* (Kjemtrup e Conrad, 2000). I casi clinici nei bovini si osservano solitamente da maggio a giugno con un secondo picco in settembre e ottobre ed anche i casi umani si presentano da maggio a settembre; la distribuzione dei casi corrisponde al picco di attività delle ninfe di *Ixodes ricinus* in tarda primavera e degli adulti in autunno, sebbene entrambi gli stadi possano esistere contemporaneamente. Le larve di zecca invece sono più attive in estate, e si pensa giochino un ruolo minore nella trasmissione al bestiame, a causa della loro distribuzione a gruppi e del maggiore nutrimento su altri ospiti. La simultanea presenza di zecche del genere *I. ricinus*, di popolazioni bovine infette e dell'insorgenza di casi umani, implica *I. ricinus* come vettore di *B. divergens* nell'uomo in Europa.

Allevatori, forestali, campeggiatori ed escursionisti che frequentano aree rurali sono le classi di popolazione maggiormente a rischio di contrarre la babesiosi, mentre per quanto riguarda il maggior fattore di rischio d'infezione per l'uomo da *B. divergens* è la splenectomia, infatti almeno 26 dei 31 casi riportati (84%), riguardano pazienti splenectomizzati per diverse cause mediche (Gorenflot e coll., 1998; Denes e coll., 1999). Quest'osservazione, unita al fatto che anche la suscettibilità di altri primati è associata alla splenectomia, porta alla conclusione che l'infezione nell'uomo sia normalmente prevenuta dall'attività della milza (Garnham e coll., 1969). Gorenflot e coll., 1987 hanno però mostrato che le persone non splenectomizzate possono fungere da portatori asintomatici.

La sierosorveglianza di 190 donatori di sangue in Francia, ognuno dei quali aveva avuto una puntura da zecca in aree dove la babesiosi bovina da *B. divergens* è endemica, ha mostrato la reattività antigenica di due sieri all'IFI. Non è chiaro, comunque, se la presenza di anticorpi indichi un'infezione cronica subclinica o un'infezione asintomatica che era stata contratta e che rapidamente era scomparsa. In Italia sono state effettuate indagini sierologiche per la ricerca di *B. divergens* in 167 persone per verificare l'efficacia di nuovi test diagnostici specifici per questa

specie. Due soggetti hanno presentato positività sierologica per questo agente di zoonosi (Grabrielli e coll., 2010).

Non si sa se l'immunosoppressione per cause diverse oltre che la splenectomia, possa predisporre le persone alle infezioni da *B. divergens*, ma è probabile che quando l'immunosoppressione è associata alla splenectomia, la sensibilità sia maggiore (Entrican e coll., 1979; Lopez-Jimenez, 1997). La trasmissione transplacentare o perinatale negli uomini non è stata documentata (Telford III e coll., 1993) ed infine per ora, infezioni umane da *B. divergens* non sono state riportate in soggetti HIV positivi.

*B. bovis*, *B. canis*, *B. microti* e altre babesie non ben identificate sono state diagnosticate nell'uomo in Europa, basandosi sulle caratteristiche morfologiche e sulla reattività antigenica. E' interessante notare che sono rari i casi segnalati di babesiosi da *B. microti* nell'uomo in Europa, nonostante essa sia stata riscontrata come parassita dei roditori in Inghilterra, Polonia e in altre parti d'Europa. In Svizzera sono stati descritti dei casi dovuti a *B. microti* (Foppa e coll., 2002). È da sottolineare però che il comportamento e la virulenza dei ceppi europei di *B. microti* sono diversi da quelli dei ceppi del Nord America.

Il primo caso italiano di babesiosi risale al 1998 in un paziente di 55 anni splenectomizzato per la malattia di Hodgkin nel 1980 e sottoposto a chemioterapia per un linfoma di III stadio. Insieme a questo caso è stata riportata anche una segnalazione in un paziente austriaco splenectomizzato di 56 anni. Entrambi i pazienti vivevano in piccole città, per passione andavano a caccia e nessuno dei due aveva animali da compagnia. Solo il paziente austriaco ha segnalato due settimane prima dell'inizio della sintomatologia la puntura di una zecca. Il caso austriaco è stato di lieve entità, quello italiano ha presentato una modesta gravità. In entrambi i casi la diagnosi è stata fatta in seguito all'osservazione, negli strisci di sangue, del parassita a livello intraeritrocitario. Entrambi i pazienti hanno risposto alla terapia antibiotica con clindamicina nel paziente austriaco e clindamicina e quintine in quello italiano.

In questi primi casi è stato indicato, come agente patogeno una nuova babesia, definita inizialmente *Babesia* EU1 (Herwald e coll., 2003). Come già accennato, questa nuova specie è stata ritrovata anche in caprioli in Slovenia e in Italia (Duh e coll., 2005a; Tampieri e coll., 2008), nelle zecche di Slovenia e Svizzera (Duh e coll., 2005b; Hilpershauser e coll., 2006), e in Francia (Bonnet e coll., 2007); la segnalazione della sua presenza anche in Germania si è avuta da Häselbarth e coll. (2007), ed è stata riportata anche in Italia in zecche nella zona di Vicenza come visto in precedenza (Cassini e coll., 2010)

E' necessaria quindi una maggiore sorveglianza per le infezioni zoonotiche legate a questi nuovi agenti patogeni, anche perché è probabile che i test utilizzati in passato non siano stati in grado di distinguere questa specie e di conseguenza non è possibile conoscere la sua reale prevalenza.

Anche al di fuori dell'Europa e degli Stati Uniti sono state descritte infezioni umane con *Babesia* spp. Tre casi asintomatici ben documentati sono stati segnalati in Messico, con l'isolamento del parassita in seguito ad inoculazione nel criceto (Osorno e coll., 1976). I sieri di questi uomini infetti sono stati testati per *B. canis* e *B. bigemina* e hanno mostrato positività, ma l'identificazione di specie di questi isolati non è stata fatta. Nel 1981 in Monzambico è stato ottenuto l'isolamento di *Babesia* spp. da 2 casi umani acuti e mortali e da 3 uomini infetti asintomatici

(Rodriguez e coll., 1984). I parassiti sono stati identificati in seguito all'osservazione degli strisci di sangue, all'isolamento nei criceti e alle colture di sangue. In Africa, casi sporadici umani di infezione da *Babesia* spp. sono stati riportati nelle regioni del nord, dall'Egitto (Michael e coll., 1987) e dalle Isole Canarie (Olmeda e coll., 1997). Questi studi mettono in evidenza che la maggiore consapevolezza del parassita può portare all'identificazione di infezioni umane in aree precedentemente non considerate endemiche, e che la babesiosi umana è probabilmente più diffusa di quanto non si creda.

Nelle regioni malariche, la babesiosi umana può essere diagnosticata come infezione da *Plasmodium* spp., a causa della similarità della sintomatologia clinica, della morfologia del parassita negli strisci di sangue, sottostimando così la sua presenza. In Sudan ad esempio, monitorando infezioni umane di malaria dagli strisci di sangue, 20 dei pazienti esaminati su 137 (14,5%), hanno mostrato merozoiti intraeritrocitari più simili a *Babesia* spp. che a *Plasmodium* spp. (Suliman e coll., 1998). Similmente, in Sudafrica diagnosi iniziali di malaria sono state poi riconosciute come casi di babesiosi umana (Bush e coll., 1990). La possibilità di coinfezione di babesia e malaria è stata descritta in un bambino in Costa d'Avorio, con una parassitemia del 35% (Vermeil, 1983).

A Taiwan nel 1977 è stata descritta nei roditori una *Babesia* spp. morfologicamente simile a *B. microti* (Van Peenen e coll., 1977). Hsu e Cross (1977), nello stesso anno scoprirono che alcuni residenti a Taiwan erano sieropositivi per *B. microti* ed anche in anni più recenti, nella stessa area, un caso umano di babesiosi con segni clinici modesti, è stato ascritto a una babesia strettamente correlata a *B. microti* (Shih e coll., 1997).

Le manifestazioni di malattia della babesiosi umana sono causate dallo stadio asessuale di riproduzione degli organismi negli eritrociti dell'ospite e alla conseguente lisi dei globuli rossi. La varietà degli aspetti clinici è probabilmente direttamente correlata al grado di parassitemia del sangue. Il periodo di incubazione, da quando la zecca trasmette l'organismo a quando compaiono i sintomi, varia da 1 a 6 settimane e può essere anche di 3 mesi (Benach e Habicht, 1981). I fattori dell'ospite associati con la variabilità biologica della presentazione della malattia sono scarsamente conosciuti.

La sintomatologia è spesso descritta come una infezione simile a malaria, con:

- malessere, freddo, febbre improvvisa (anche fino a 40°C);
- anemia, affaticamento;
- mialgia;
- emoglobinuria spesso associata a ittero a causa della grave emolisi. In alcuni casi gravi, i pazienti hanno mostrato uno stato di shock, con danno renale ed edema polmonare (Gorenflot e coll., 1998);
- in alcuni casi viene descritta anche nausea, emesi, sudorazione notturna, perdita di peso e ematuria, che si crede siano associati con alti livelli di parassitemia (Benach e Habicht, 1981; Persing e coll., 1995).
- possono anche essere presenti epatomegalia e splenomegalia.

L'anemia emolitica, che dura per diversi giorni fino ad alcuni mesi, può essere presente in alcuni casi clinici gravi, molto comunemente in soggetti splenectomizzati o ospiti anziani. Le complicazioni sono per lo più nei soggetti immunocompromessi e possono portare ad un peggioramento con un reale stato di indebolimento o,

raramente, a una sindrome del distretto respiratorio negli adulti.

I casi europei dovuti a *B. divergens*, sono generalmente più gravi di quelli determinati da *B. microti* in USA. La comparsa dei sintomi si ha entro 1-3 settimane dalla puntura della zecca (Gorenflot e coll., 1998).

Più della metà dei casi sostenuti da *B. divergens* evolvono ad insufficienza renale ed edema polmonare. Sono segnalate anche ecchimosi, petecchie, congestione cardiaca e coma. La malattia è in genere fulminante e dura circa una settimana, esitando nella morte in un terzo dei pazienti (Vannier e Krause, 2009).

La presenza o l'assenza di molte alterazioni negli esami di laboratorio dipendono dal livello di parassitemia (Pruthi e coll., 1995). Nei casi clinicamente accertati l'esame rileva:

- alti livelli di transaminasi, fosfatasi alcalina, bilirubina libera e deidrogenasi lattica nel siero;
- anemia normocromica e normocitica, trombocitopenia ed occasionalmente leucopenia.

Questo può essere dovuto alla risposta dei mediatori TNF dell'infiammazione. Tuttavia, alla luce delle recenti scoperte di possibili coinfezioni negli uomini con più agenti trasmessi da zecche, è possibile che alcuni degli aspetti più variabili nella malattia possano essere associati a questa evenienza.

Ci sono probabilmente molte caratteristiche dell'ospite che influenzano la gravità della babesiosi; fra queste sono state indicate l'età e l'immunocompetenza. Si è visto, infatti, che le infezioni più gravi sostenute da *B. microti* si verificano nei soggetti più anziani, negli immunocompromessi da virus HIV, da terapie immunodepressive o da presenza di tumori maligni (Mathewson e coll., 1984; Ruebush e coll., 1977; Krause e coll., 2008) e negli splenectomizzati (Rosner e coll., 1984). Per quanto riguarda l'età sembra esserci una correlazione fra la gravità dell'infezione e l'età del paziente (White e coll., 1998). Nei pazienti infetti con *B. microti*, la maggior parte dei casi clinici si presenta in età comprese fra i 50 e i 60 anni (Benach e coll., 1981; Krause e coll., 1996a).

Tra i fattori addizionali che aumentano la gravità della babesiosi nell'uomo, oltre all'età, abbiamo:

- asplenia: quasi tutti i casi di babesiosi in Europa (circa 83%) sono stati attribuiti a *B. divergens*; queste infezioni sono più gravi e quasi sempre interessano pazienti splenectomizzati prima dell'infezione (Gorenflot e coll., 1998). Questi casi sono stati spesso fatali, al contrario di molti casi nel Nord America causati da *B. microti* in pazienti normo-splenici.
- coinfezioni con altri agenti infettivi (Teutsch e coll., 1980; Smith e coll., 1986; Ong e coll., 1990; Falagas e Klempner, 1996; Telford III e Spielman, 1998): in questo caso si ha un'eccezione a quanto appena detto, in quanto ci sono casi segnalati nell'ovest degli Stati Uniti causati da WA1 (Quick e coll., 1993; Thomford e coll., 1994), CA1 (Jerant e coll., 1993; Persing e coll., 1995) e MO1 (Herwaldt e coll., 1996) in cui le manifestazioni possono essere più gravi anche in soggetti non splenectomizzati (Krause e coll., 1996b), forse per un effetto immunosoppressivo che facilita l'istaurarsi dell'infezione, o forse per sinergie specifiche tra organismi che occupano lo stesso ciclo di trasmissione. In pazienti con infezione da *B. burgdorferi* (agente causale della Malattia di Lyme) e *B. microti* è stato mostrato un aumento della gravità della malattia (Krause e coll., 1996a).

## 2.10 DIAGNOSI

La diagnosi di piroplasmosi deve iniziare con l'anamnesi, che include manifestazioni cliniche, viaggi o spostamenti in aree endemiche, punture di zecche o esposizione a zone infette, recenti trasfusioni di sangue e splenectomia, per quanto riguarda l'uomo. Anche per gli animali l'esposizione a zecche o il rinvenimento di queste sugli animali è considerato un importante dato anamnestico.

### 2.10.1 EMATOLOGIA

L'osservazione degli strisci di sangue per valutare la presenza dei parassiti all'interno degli eritrociti è la tecnica più frequentemente utilizzata per la diagnosi di piroplasmosi sia negli animali che nell'uomo. Gli strisci dal sangue periferico vengono colorati con colorazione di Wright o con Giemsa.

Morfologicamente, c'è elevata variabilità nella forma; semplici cerchi (anulare), trofozoiti a coppia o singoli a forma di pera (piriformi), e la rara ma a volte descritta croce Maltese. Le infezioni da *B. microti* nell'uomo possono avere una parassitemia fino all'85%. La durata dell'evidenziazione della parassitemia negli strisci di sangue varia da 2 settimane (Anderson e coll., 1986) a 3 settimane (Ruebush e coll., 1977), fino anche a 7 mesi come accaduto in un paziente splenectomizzato (Sun e coll., 1983).

L'osservazione degli strisci di sangue è importante per la diagnosi di babesiosi, in particolare per distinguere tra piccole e grandi babesie, per valutare la contemporanea presenza di altri emoparassiti e per intraprendere una scelta terapeutica adeguata (Kramer e coll., 2010).

In generale, l'analisi degli strisci di sangue è un processo abbastanza soggettivo e di conseguenza dipende dall'esperienza dell'osservatore e dal tempo impiegato per l'osservazione dello striscio. La necessità di discriminare la morfologia di *Babesia* e basse parassitemie, richiede la necessità di utilizzare ulteriori analisi. In molti casi, un'accurata anamnesi del paziente, la manifestazione clinica, e l'osservazione di caratteristiche morfologiche sono sufficienti a stabilire la giusta diagnosi; altrimenti devono essere utilizzate tecniche sierologiche o molecolari.

Ci sono alcune caratteristiche da valutare attentamente nel caso dell'osservazione dello striscio di sangue. Le forme circolari all'interno degli eritrociti possono variare molto e possono, nell'uomo, essere confuse con *P. falciparum* (Pruthi e coll., 1995). Ci sono stati casi in cui ai pazienti è stata all'inizio erroneamente diagnosticata malaria, con un ritardo nell'utilizzo del trattamento adeguato, che nei casi più gravi (di solito dovuti ad infezioni da *B. divergens*) può essere fatale.

### 2.10.2 SIEROLOGIA ED IMMUNOLOGIA

Test sierologici con IFI sono utilizzati nella diagnosi di infezioni da *Babesia* spp. soprattutto nelle infezioni croniche (Telford III e Spielman, 1998). Questi test utilizzano antigeni verso babesia prodotti nell'hamster. L'IFI è sia sensibile che

specifica ed è attualmente consigliata come metodica sierologica (Chisholm e coll., 1978).

Il titolo di cutoff per la determinazione di un risultato positivo varia da laboratorio a laboratorio; solitamente, titoli al di sopra di 1:64 nell'uomo e 1:80 nei cani, sono diagnostici (Krause e coll., 1994; Kramer e coll., 2010). Nella fase acuta di infezione, il titolo anticorpale può essere 10-20 volte più alto del cutoff, con una fase di declino dopo un periodo di tempo variabile (settimane o mesi) (Pruthi e coll., 1995). Il titolo anticorpale può rimanere alto per 13 mesi fino a 6 anni dopo l'infezione (Persing e coll., 1995). Nonostante la persistenza degli anticorpi non rifletta un'infezione misurabile (Persing e coll., 1995; Ruebush e coll., 1981), il livello delle IgG diminuisce meno velocemente nei pazienti persistentemente infetti, rispetto ai pazienti che guariscono in meno di 3 mesi (Krause e coll., 1998).

La persistenza dell'infezione è correlata, invece, con livelli anticorpali persistentemente elevati nelle infezioni da *B. gibsoni* nel cane (Conrad e coll., 1991).

L'IFI rimane il test sierodiagnostico di scelta per rilevare anticorpi verso babesia. L'IFI per *B. microti* presenta l'88-96% di sensibilità, 90-100% di specificità, 69-100% di valore predittivo positivo e 69-99% di valore predittivo negativo (Krause e coll., 1994).

Uno svantaggio del test sierologico è che altri protozoi, in particolare altri piroplasmii, possono provocare cross-reattività dando risultati falsi-positivi, specialmente quando si vanno a ricercare le IgM. I test sierologici sono ampiamente utilizzati per la loro semplicità (Brüning, 1996), ma la qualità degli antigeni disponibili è fondamentale per lo sviluppo di test specifici e sensibili. Nel caso per esempio di *Theileria equi* e *Babesia caballi*, distinguere una specie piuttosto che l'altra è un dato importantissimo per la prognosi e la terapia; *T. equi* infatti induce infezioni più gravi ed è più resistente ai trattamenti (de Wall, 1992).

Si può inoltre avere difficoltà a discriminare una specie di babesia rispetto ad un'altra, a causa appunto di meccanismi di cross-reaizione ed inoltre infezioni recenti potrebbero determinare esito negativo al test di immunofluorescenza in quanto non è ancora presente una risposta anticorpale. Risultati falsamente positivi possono infatti presentarsi in caso di infezioni acute o iperacute; per confermare tali infezioni è utile ad esempio monitorare il titolo anticorpale (Solano-Gallego e Baneth, 2011).

Pazienti con malattie del tessuto connettivale come il lupus eritematoso sistemico e l'artrite reumatoide (Persing e coll., 1995), possono ugualmente dare risultati falsamente-positivi per altri meccanismi.

L'IFI per *B. divergens* è utile soprattutto per valutazioni retrospettive, visto che gli anticorpi per *B. divergens* vengono prodotti dopo 7-10 giorni dalla comparsa dell'emoglobinuria, inoltre è stato evidenziato che *B. divergens* cross-reagisce con numerose specie di *Plasmodium* e *Babesia*, dando problemi all'IFI (Gorenflot e coll., 1998).

L'IFI per WA1 è stata utilizzata in USA per individuare i soggetti potenzialmente infetti (Quick e coll., 1993; Persing e coll., 1995; Fritz e coll., 1997), sebbene un titolo soglia non sia stato ancora ben stabilito.

### 2.10.3 DIAGNOSI MOLECOLARE

Sebbene i casi clinici siano generalmente diagnosticati con le metodiche tradizionali, infezioni lievi spesso rimangono non diagnosticate e non trattate. La scoperta di queste infezioni necessita di tecniche maggiormente sensibili. Con lo sviluppo di tecniche di PCR, il monitoraggio di casi lievi di babesiosi è diventato possibile. Queste metodiche si basano sull'amplificazione di porzioni molto conservate del DNA.

I protocolli per diagnosticare le infezioni da babesia hanno avuto molto successo nella diagnosi delle infezioni da *B. microti*. Sono stati disegnati primers specifici per il gene 18S rRNA (Persing e coll., 1992). Questo gene viene utilizzato perché contiene regioni conservate che permettono l'utilizzo di primers universali per identificare babesie anche di specie non ancora descritte. In letteratura sono anche descritti vari primers per amplificare sempre, parzialmente o in toto, il DNA che codifica per il 18S rRNA; ad esempio i primer definiti RLB-F2 ed RLB-R2 amplificano per una porzione di 460-520 bp (Centeno-Lima e coll., 1998). Invece i primer CRIPTO F e CRIPTO R, sono stati utilizzati ad esempio per verificare il DNA del primo caso documentato di babesiosi nell'uomo in Italia e Austria (Herwaldt e coll., 2003).

Questa metodica è in grado di rilevare 3 merozoiti di *B. microti* in un volume di 100µl, e di identificare correttamente il 95% di infezioni acute (Krause e coll., 1996a). La PCR si è mostrata tanto sensibile e specifica per la ricerca di *B. microti* quanto l'inoculazione in hamster, con il vantaggio che la diagnosi si ha entro 2-3 giorni, rispetto a 1-6 settimane dell'inoculazione degli animali.

Come ogni tecnica diagnostica, la sensibilità e la specificità deve essere stabilita da ogni laboratorio diagnostico, in relazione all'accuratezza dell'interpretazione dei risultati. La standardizzazione di un test necessita la presa in considerazione delle specie dell'organismo in esame, della distribuzione geografica dell'organismo nelle regioni considerate e dello stadio dell'infezione, acuto o cronico (Sackett e coll., 1985). Sebbene sia uno strumento diagnostico molto efficace, attualmente la PCR è utilizzata nella diagnosi insieme alla valutazione dei segni clinici e ad altri strumenti diagnostici quali la lettura degli strisci di sangue e l'esame sierologico.

Pazienti con DNA di *Babesia* spp. rilevabile nel sangue sono parassitemici; vari studi hanno dimostrato che il DNA del parassita viene rapidamente eliminato in assenza di replicazione, quindi la presenza di DNA è indice di una infezione attiva (Nocton e coll., 1994, Krause e coll., 1998, Kain e coll., 1993). Negli individui cronicamente infetti però, la sensibilità della PCR sul 18S è più bassa a causa del minor numero di parassiti in circolo (Dalrymple e coll., 1992).

La successiva analisi delle sequenze dei frammenti amplificati e il confronto con sequenze conosciute contenute in un database, permette l'identificazione dell'agente infettante. Oltre alla PCR tradizionale, altre metodiche molecolari sono state utilizzate per la diagnostica delle piroplasmosi, quali ad esempio RT-PCR e nested PCR. La RT-PCR permette un'analisi di tipo quantitativo oltre che qualitativo. Protocolli di seminested-PCR sono invece stati messi a punto per discriminare ad esempio le diverse specie che possono colpire i cani (*B. canis*, *B. rossi*, *B. vogeli* e *B. gibsoni*) (Birkenheuer e coll., 2004).

Sono state messe a punto anche metodiche RLB con le quali i prodotti di PCR

vengono ibridati su membrane contenenti sonde specifiche per le diverse specie di *Babesia* per il rinvenimento simultaneo di co-infezioni. Ad esempio, in Africa, l'RLB viene utilizzato per confermare la presenza di *B. vogeli* e *B. rossi* contemporaneamente (Matjila e coll., 2004).

Anche la metodica RFLP (analisi dei polimorfismi con enzimi di restrizione) è utilizzata per discriminare le diverse specie di *Babesia* (Carret e coll., 1999; Jefferies e coll., 2007a; Solano-Gallego e coll., 2008).

#### 2.10.4 COLTURE CELLULARI

Le coltivazione in vitro di *Babesia*, originariamente usata per studiare meglio il parassita, è uno strumento che può permettere di ottenere un'amplificazione dei parassiti in modo da confermare una diagnosi anche in soggetti in cui l'infezione non è stata individuata (Schuster, 2002). Questa metodica può anche permettere l'identificazione di infezioni miste, in quanto lo striscio di sangue o la PCR potrebbero rivelare inizialmente la presenza di una determinata specie i cui elementi parassitari presenti in maggiore quantità al momento del prelievo di sangue, ma potrebbe non rivelare la presenza di altri patogeni perché presenti in quantità inferiore. In uno studio condotto su bovini di razza Romagnola asintomatici per piroplasmosi è stato possibile identificare la presenza di *Babesia major* solo in seguito a coltura cellulare. L'esame microscopico iniziale mostrava forme parassitarie di diverse dimensioni riconducibili ad almeno due specie di piroplasmii, ma l'analisi molecolare permetteva di rilevare solamente *Theileria* spp. Solo la coltura cellulare ha permesso a *B. major*, presente in quantità decisamente inferiore, di rendersi manifesta e poter essere identificata (Galuppi e coll., 2011).

Diversi autori hanno messo a punto tecniche colturali applicandole agli eritrociti di diversi mammiferi. Thomford e coll. (1993) hanno utilizzato il sangue di cervo-mulo (*Odocoileus hemionus*) e di pecora selvatica bighorn (*Ovis canadensis*), ottenendo in coltura una parassitemia inferiore allo 0,01%, partendo da campioni di sangue in cui non erano stati evidenziati i parassiti. Holman e coll. (1988; 1993), invece, ottennero delle colture dal sangue di un cervo che presentava 1 globulo rosso infetto/6000 e dal sangue di quattro cavalli risultati negativi allo striscio. Un lavoro più recente (Holman e coll., 1998) riporta l'utilizzo di alcuni cavalli, che si erano infettati naturalmente con *Babesia equi*, ma che non manifestavano né positività allo striscio, né segni clinici, dai quali è stata ottenuta una coltura continua. Per identificare i soggetti positivi era stata utilizzata la PCR.

Le colture in vitro possono essere utilizzate sia per coltivare e moltiplicare *Babesia* spp., sia per mantenere i parassiti vitali senza ricorrere a infezioni sperimentali, che per studiare meccanismi di invasione eritrocitaria. In questo caso si parte da materiale infetto che viene coltivato su sangue sano. Il terreno di coltura utilizzato, può essere specifico per ogni tipo di *Babesia*.

#### 2.10.5 THEILERIA SPP.

Come per le babesiosi, un primo importante fattore da considerare, è l'anamnesi: la East Coast Fever infatti, si presenta solamente in aree in cui è presente il vettore,



anche se sono stati segnalati casi in animali in zone diverse, in seguito all'importazione di soggetti infestati da zecche e provenienti da zone endemiche (Capelli e coll., 2010).

Nell'animale in vita i macroschizonti si possono facilmente ritrovare in strisci di materiale a partire da biopsie linfonodali (come anche per *T. annulata* e per il complesso *T. orientalis*). I parassiti possono anche essere rilevati nelle fasi avanzate in strisci ematici colorati con Giemsa, e nel caso di *T. parva* fino all'80% dei globuli rossi può risultare infetto. Nell'animale morto si possono rilevare i macroschizonti in impronte su vetrino di linfonodi e milza (Capelli e coll., 2010).

Se viene rilevata una bassa parassitemia, ma non vengono rinvenuti schizonti, questo può indicare che l'animale sia portatore del parassita.

Possono essere utilizzate anche tecniche molecolari o sierologiche, come ad esempio l'immunofluorescenza indiretta, con la finalità di individuare animali che abbiano superato la malattia (Capelli e coll., 2010).

Per quanto riguarda invece la coltivazione in vitro è stata ottenuta attraverso diverse tecniche, correlate anche alla fonte di parassiti: sangue periferico, cellule linfatiche o tessuti (Brown, 1987); inoltre anche lo stadio all'interno del vettore è stato riprodotto in coltura.

Un'altra tecnica, recentemente sviluppata, si basa sul rilevamento di antigeni intracellulari del parassita. Più precisamente è stato descritto un metodo di citometria di flusso che permette di ritrovare gli schizonti intracellulari di *T. parva* negli stadi iniziali dell'infezione e di ottenere una precisa quantificazione delle cellule parassitate; è un metodo che si è rivelato essere molto sensibile e molto specifico ed è una buona alternativa ad alcune colture tissutali (Rocchi e coll., 2008).

## 2.11 TERAPIA

### 2.11.1 BABESIA SPP.

#### 2.11.1.1 Negli animali

**Bovino:** inizialmente furono utilizzati il Tripan Blu ed i derivati del chinuronio, fino a che, nel 1940, furono scoperte le diamidine aromatiche; queste sono tutt'ora largamente usate, oltre ad un farmaco più moderno, l'imidocarb dicloridrato (carbanilide aromatica).

L'imidocarb, nelle forme cliniche di babesiosi nel bovino, diminuisce la parassitemia ed impedisce la comparsa dell'anemia; è efficace contro tutte le specie di *Babesia* già alla dose di 1 mg/kg se somministrato per via intramuscolare o sottocutanea, ma nella pratica si preferisce usare un dosaggio di 2 mg/kg. Questo farmaco agisce direttamente sul parassita determinando un'alterazione del numero e delle dimensioni dei nuclei, oltre che della struttura del citoplasma (Beveridge, 1969).

Per quanto riguarda le diamidine aromatiche, le più diffuse sono l'amicarbalide e il diminazene, che interferiscono con la glicolisi aerobia o con la sintesi del DNA del parassita.

L'amicarbalide riduce efficacemente la parassitemia e la mortalità dei bovini infetti da *B. bovis* e *B. bigemina*. La dose terapeutica standard è di 5 mg/kg sottocute o intramuscolo, ma in casi iperacuti ed in soggetti adulti la dose può essere

raddoppiata; inoltre, se l'emoglobinuria persiste oltre le 24 ore successive al trattamento, si deve ripeterlo.

Il diminazene invece, presenta un'attività incostante nei confronti delle diverse specie di *Babesia* parassite del bovino: al dosaggio terapeutico di 3.5 mg/kg per via sottocutanea o intramuscolo, elimina rapidamente dal sangue *B. bigemina*, ma ha solamente una parziale efficacia verso *B. bovis* e *B. divergens*, reperibili nel sangue anche per 4 giorni dopo il trattamento (McDougald e coll., 1991).

**Equino:** nel cavallo il trattamento per le piroplasmosi prevede l'uso integrato di una terapia di supporto e di un trattamento chemioterapico. Il supporto terapeutico può essere effettuato con fluidoterapia, trasfusioni di sangue e integrazioni vitaminiche. Per entrambe le forme parassitarie che possono colpire i cavalli, le molecole utilizzate sono le stesse ma a dosaggi differenti.

L'imidocarb dipropionato viene impiegato alla dose di 2-3 mg/kg in due somministrazioni a distanza di 24 ore. Nel caso di infezioni da *B. caballi*, questo trattamento è sufficiente alla sterilizzazione degli animali; in corso di theileriosi da *T. equi*, invece, questo trattamento può portare alla scomparsa dei sintomi ma non elimina completamente i parassiti. L'effetto parassitocida può essere ottenuto con 4 dosi da 4 mg/kg ripetute a distanza di tre giorni l'una dall'altra. Questo dosaggio elevato può determinare la comparsa di effetti collaterali quali letargia, sudorazione e dolori addominali.

L'amicarbalide è un altro principio attivo efficace alla dose di 9-10 mg/kg se somministrato in singola dose per via intramuscolo o a dosaggio dimezzato se somministrato in due volte a distanza di 24 ore. Questa posologia è indicata per entrambe le forme parassitarie ma il farmaco presenta gravi effetti collaterali se impiegato a dosi troppo elevate.

Un'altra molecola utilizzabile è il diminazene aceturato alla posologia di due dosi da 5 mg/kg intramuscolo a distanza di 24 ore per *B. caballi*, o di due dosi da 6-12 mg/kg distanziate di 48 ore nel caso di *T. equi*. Anche questo farmaco ha scarsa maneggevolezza (Otranto e Traversa, 2010).

**Cane:** come negli equini, anche nel cane le babesie di maggiori dimensioni (*B. canis*) sono più sensibili alla terapia rispetto a quelle più piccole (*B. gibsoni*).

I babesicidi attivi nei confronti di *B. canis* da utilizzare nel cane sono: imidocarb dipropionato alla dose di 5 mg/kg per via sottocutanea o intramuscolare in due somministrazioni distanziate di 14 giorni; diminazine in unica somministrazione al dosaggio di 3.5 mg/kg; la fenamidina a 15 mg/kg anche in questo caso in unica somministrazione o eventualmente ripetuta dopo 24 ore e il trypan blue, un farmaco istolesivo, che deve essere somministrato alla dose di 10 mg/kg. Tra questi farmaci la diminazina è quello con indice terapeutico più basso e sembra che si possa avere tossicità dose-dipendente. Come supporto allo stato anemico del paziente si può considerare la possibilità di una trasfusione di sangue.

In corso di babesiosi da *B. gibsoni* i farmaci utilizzabili sono ancora diminazina e fenamidina, con la stessa posologia utilizzata per *B. canis*, oltre al parvaquone alla dose di 20 mg/kg in unica somministrazione. Il farmaco di elezione per questa specie di piroplasma sembra essere la diminazina (Kramer e coll., 2010).

**Gatto:** Il farmaco di elezione per il trattamento della babesiosi nel gatto è la primachina fosfato, un farmaco antimalarico, somministrato per via orale alla dose di 0.5 mg/kg. Questo trattamento non garantisce comunque la sterilizzazione degli animali ed inoltre induce facilmente vomito (Kramer e coll., 2010).

**Suino:** le informazioni sulla terapia in corso di babesiosi sono poche; le soluzioni possibili sono il Trypan Blue in soluzione all' 1% via endovenosa alla dose di 10-25 ml per animale; il Berenil (diminazene aceturato) sempre endovena in soluzione al 7% alla dose di 3.5mg/kg per *B. trautmanni* (Puccini e coll., 1958) e la fenamidina sottocute in soluzione al 40% ed alla dose di 1.5 ml/45 kg (Lawrence e Shone, 1955).

#### 2.11.1.2 Nell' uomo

Il trattamento nell'uomo varia in funzione della specie di *Babesia* coinvolta nell'infezione.

***B. microti*:** in caso di sintomatologia lieve o moderata il trattamento con atovaquone e azitromicina per 7-10 giorni risulta efficace (Wormser e coll., 2006; Krause e coll., 2000). Questa combinazione sembra avere la stessa efficacia di quella di clindamicina e quinine, utilizzata inizialmente nella terapia della babesiosi, ma con una minore incidenza e gravità di effetti collaterali (Vannier e Krause, 2009). La terapia con quinine e clindamicina può determinare diminuzione dell'udito, sincopi, ipotensione e disturbi gastrointestinali (Clyde e coll., 1975). Il nuovo protocollo invece può portare sintomi più lievi quali disturbi gastroenterici e rash cutanei.

In corso di babesiosi grave, il trattamento di clindamicina e quinine è ancora quello di elezione (Wormser e coll., 2006; Wittner e coll., 1982) protratto per 7-10 giorni, eventualmente associato a trasfusione di sangue in pazienti con parassite mia elevata (> 10%) o che hanno coinvolgimento renale, polmonare o epatico (Cahill e coll., 1981; Vyas e coll., 2007).

***B. divergens* e *B. divergens like*:** morbidità e mortalità sono elevate in corso d'infezione da *B. divergens*, portando a considerare questa babesiosi un'emergenza medica (Gorenflot e coll., 1998; Zintl e coll., 2003). Il trattamento raccomandato prevede una trasfusione e l'utilizzo associato di clindamicina e quinine. È bene eseguire la trasfusione di sangue prima della chemioterapia (Gorenflot e coll., 1998) in quanto, nonostante la clindamicina in vitro sia efficace da sola, il rischio di una rapida crescita della parassitemia con conseguente emolisi e danno renale sono generalmente elevati (Brasseur e coll., 1998). In casi lievi (1% di parassitemia) può non essere necessaria la trasfusione (Denes e coll., 1999). Anche i casi riconducibili a *B. divergens like* segnalati in Kentucky e Washington State furono trattati con questa combinazione o con quinidine con successo, mentre il paziente del Missouri morì nonostante il trattamento di clindamicina e quinine (Herwaldt e coll., 1996; 2004; Beattie e coll., 2002).

Dopo la 'clearance' del parassita e la risoluzione dell'emolisi, potrebbe persistere un'anemia non rigenerativa per almeno 1 mese, richiedendo così trasfusioni aggiuntive (Telford III e coll., 1993).

Pazienti che sono immunocompromessi per cause iatrogene (Cahill e coll., 1981), HIV-positivi (Machtiger e coll., 1993) e gravemente infetti da *Babesia* spp. alcune volte non rispondono alla terapia antimicrobica e richiedono ulteriori terapie. Trattamenti alternativi sono stati studiati in caso di fallimento del trattamento e a causa della tossicità di quinine e clindamicina.

Altri farmaci promettenti per il trattamento di infezioni umane da *B. divergens* sono imidocarb dipropionato e idroxiaptoquinone atovaquone.

L'imidocarb, benché non sia registrato per uso umano, è il più efficace per il

trattamento di *B. divergens* nei bovini ed è stato utilizzato con successo, con specifico permesso, per il trattamento di due casi irlandesi (Egan e Duggan, 1990). L'atovaquone è invece registrato per uso umano e si è dimostrato in vitro migliore dell'imidocarb nell'eliminare i parassiti dagli eritrociti umani e in vivo in modelli con gerbilli (Pudney e Gray, 1997). Il farmaco ha mostrato anche effetto profilattico a dosaggi giornalieri bassi, e gli autori hanno indicato che l'atovaquone può essere utilizzato sia per il trattamento della malattia clinica sia a scopo profilattico nei soggetti asplenicici a rischio di infezione. Alcuni farmaci utilizzati per abbassare il colesterolo come lovastatina e simvastatina si sono dimostrati capaci di inibire lo sviluppo in vitro di *B. divergens* e *P. falciparum* negli eritrociti umani (Grellier e coll., 1994). E' stato dimostrato che tale effetto è dovuto alla necessità del parassita di utilizzare gli acidi grassi e il colesterolo presenti nel plasma dell'ospite. Per l'uso in vivo, comunque, devono essere prodotti nuovi derivati con migliore biodisponibilità, in quanto sia lovastatina che simvastatina hanno una emivita breve nel plasma e sono rapidamente metabolizzate a livello epatico.

Altri farmaci sono stati utilizzati nelle infezioni da babesiosi comprese cloroquine, tetracicline, primaquine, sulfadiazine e pirimetamine con risultati variabili.

### 2.11.2 THEILERIA SPP.

***T. parva*:** la scelta del farmaco da utilizzare dipende anche dal momento dell'infezione: le tetracicline infatti, sono efficaci se somministrate al momento dell'infezione, ma non hanno effetto se i casi sono già clinicamente evidenti. In queste situazioni è preferibile quindi utilizzare i naftachinoni, tra cui il parvaquone, il buparvaquone e un farmaco anticoccidico, l'alofuginone (Capelli e coll., 2010). Il parvaquone è molto efficace contro le theileriosi bovine (*T. parva* e *T. annulata*) quando viene somministrato nelle fasi iniziali dell'infezione; in queste condizioni esso permette lo sviluppo di un'immunità protettiva, senza la comparsa della sintomatologia. Il buparvaquone è invece caratterizzato da una degradazione metabolica più lenta, avendo così un'efficacia maggiore.

**Complesso *T. buffeli/sergenti/orientalis*:** non esistono molte informazioni sulle possibilità terapeutiche, anche se i farmaci d'elezione sembrano essere sempre parvaquone e buparvaquone.

***T. hirci*:** come per *T. parva*, sono 3 i farmaci che risultano efficaci: il parvaquone (una sola somministrazione intramuscolo alla dose di 20 mg/kg), il buparvaquone (doppia somministrazione alla dose di 2.5 mg/kg intramuscolo) o infine l'alofuginone (una sola somministrazione *per os* alla dose di 1.2 mg/kg). Per quanto riguarda invece *T. ovis*, data la sua scarsa patogenicità, il trattamento non è di norma necessario (Garippa e coll., 2010).

In generale, quindi i farmaci d'elezione sono i naftochinoni, che agiscono bloccando il trasporto degli elettroni a livello dell'ubiquinone (o Coenzima Q10, presente nei mitocondri) e la sua tossicità selettiva si pensa derivare dalla diversità dell'ubiquinone nei parassiti e nei mammiferi (Genchi e coll., 2010).

Esiste però un problema per quanto riguarda l'utilizzo di parvaquone e buparvaquone: questi due farmaci, infatti, infiltrano il muscolo dei bovini trattati e non sono rapidamente eliminati dall'organismo, rappresentando così un pericolo per la salute pubblica nel caso in cui latte e carne dei bovini trattati vengano consumati

dall'uomo (McHardy e coll., 1985).

Una recente tendenza, dovuta all'interesse sempre crescente verso farmaci di origine naturale, ha indirizzato la ricerca verso nuove tipologie di medicinali. A questo proposito, Mirzaei (2007) ha effettuato uno studio su 50 bovini affetti da theileriosi tropicale; questi sono stati trattati utilizzando l'estratto della pianta *Peganum harmala*, alla dose di 5 mg/kg per 5 giorni consecutivi; la percentuale dei soggetti trattati e che hanno risposto è stata del 78% (39 bovini). Il risultato ottenuto è stato quindi molto soddisfacente se si considera che il tasso di animali che rispondono al parvaquone sembra essere del 60.7%, mentre quello per il buparvaquone di 88.7% (Hashemi-Fesharki, 1991); l'aspetto positivo inoltre è che questo estratto è un farmaco naturale che non infiltra il muscolo dell'animale (Puzii e Serov, 1983).

Un'altra problematica recentemente osservata, sempre per quanto riguarda il buparvaquone, è la comparsa di resistenza in *T. annulata*. Questa segnalazione è stata effettuata da Mhadhbi e coll. (2010) in Tunisia: fino a questo momento in letteratura non erano mai stati riportati casi di resistenza, ma dopo aver trattato 7 vacche con buparvaquone per due volte (2.5 mg/kg e 5 mg/kg), 4 sono comunque morte. Il ceppo di *T. annulata* isolato dalle vacche morte è stato quindi utilizzato per infettare sperimentalmente un vitello, dopo di che su di esso hanno lasciato pasteggiare delle zecche che sono poi state utilizzate per infettare altri 3 vitelli. Questi, nonostante fossero poi stati sottoposti a trattamento con buparvaquone, non hanno mostrato i classici benefici del farmaco, tra cui la rapida diminuzione della parassitemia e il veloce recupero. Si può quindi ipotizzare che il ceppo in questione di *T. annulata* abbia sviluppato resistenza al buparvaquone (Mhadhbi e coll., 2010).

## 2.12 PROFILASSI

### 2.12.1 NEGLI ANIMALI

La prevenzione in corso di malattie trasmesse da zecche come nel caso della piroplasmosi, prevede diversi interventi da attuare sulle zecche stesse, sugli animali e nell'ambiente.

Per quanto concerne le zecche si rimanda al capitolo precedente.

Per controllare le infezioni da *Babesia divergens* nei bovini, alcuni studiosi hanno proposto di utilizzare aree infestate da zecche come pascolo per ovini, resistenti a questo patogeno, in modo da diminuire il grado di infezione nelle zecche stesse, per poi poter riutilizzare, dopo lunghi periodi, quegli stessi pascoli per i bovini (Taylor e coll., 1983). L'infezione nelle zecche può durare anche 2 anni in assenza di ospiti sensibili (Donnelly e Peirce, 1975). L'approccio però più pratico e immediato è quello di applicare acaricidi sintetici sul bestiame soprattutto durante il periodo di maggior esposizione (Purnell, 1981; Gray e Murphy, 1985).

Generalmente i bovini di età compresa tra 3 e 9 mesi non manifestano sintomi di babesiosi. La resistenza degli animali giovani è la base della stabilità enzootica (Trueman e Blight, 1978; Goff e coll., 2001; Zintl e coll., 2005), definita come una situazione in cui la relazione tra ospite, agente, vettore e ambiente è tale per cui i casi clinici sono rari o assenti (Bock e coll., 2004). Questa stabilità sta anche alla

base del successo delle vaccinazioni in aree a rischio. I bovini di età superiore ad un anno sono invece piuttosto sensibili a *Babesia*, compresi i ceppi di origine vaccinale (Trueman e Blight, 1978). La comparsa di malattia in aree endemiche è solitamente correlata alla rottura di questo equilibrio (Smith e coll., 2000). Alterazioni dell'equilibrio della malattia possono essere causate da cambiamenti climatici e da fattori umani, quali per esempio un controllo delle zecche inappropriato che determina un minor contatto tra ospiti e vettori con conseguente minore sensibilizzazione degli animali verso *Babesia* (Suarez e Noh, 2011).

Il controllo della babesiosi nei bovini può quindi essere ottenuto attraverso la gestione delle zecche, l'immunizzazione e l'impiego di farmaci anti-*Babesia* come l'imidocarb (Bock e coll., 2004) o attraverso una combinazione di questi approcci. L'impiego dell'imidocarb non è senza rischi, in quanto può determinare la comparsa di forme di resistenza tra i piroplasmici (Rodriguez e Trees, 1996; Zintl e coll., 2003) ed inoltre può residuare nei prodotti derivati (Zintl e coll., 2003; Mdachi e coll., 1995) e nell'animale stesso e inibire la risposta alla vaccinazione, in quanto sia *B. bovis* che *B. bigemina* sono sensibili (Combrink e coll., 2002).

La vaccinazione è un metodo largamente utilizzato per diminuire l'impatto di casi acuti. I vaccini sono generalmente allestiti con ceppi vivi attenuati; l'attenuazione di *B. bovis* viene ottenuta con 20-30 passaggi seriali sui manzi splenectomizzati, mentre quella di *B. bigemina* viene effettuata utilizzando passaggi di un ceppo virulento su manzi non splenectomizzati (Callow e coll., 1979; Shkap e Pipano, 2000). Il meccanismo alla base di queste attenuazioni non è ancora ben chiaro. Una caratteristica ideale per i vaccini bovini nei confronti dei piroplasmi sarebbe quella della mancata trasmissione del protozoo alle zecche. Un vaccino contro *B. bigemina* (Bock e coll., 2004) e uno prodotto in Argentina attivo nei confronti di *B. bovis* sembrano avere queste caratteristiche (Mangold e coll., 1993).

I vaccini vivi attenuati sono in genere abbastanza tollerati dagli animali di 3-9 mesi ma soggetti di età superiore possono risultare sensibili alla vaccinazione e incorrere in casi clinici gravi (Suarez e Noh, 2011).

Anche nei confronti di *B. divergens* sono state effettuate prove di vaccinazione utilizzando parassiti vivi o morti, substrati o antigeni parassitari. I vaccini vivi si sono mostrati efficaci e abbastanza sicuri, soprattutto per soggetti di età inferiore ad un anno. I ceppi vaccinali possono essere ottenuti da passaggi su animali splenectomizzati (Christensson e Moren, 1987) o su gerbilli (Friedhoff e coll., 1989; Gray e coll., 1989; 1995). Il problema fondamentale dei ceppi vivi attenuati è la persistenza della virulenza, che può quindi determinare la comparsa di babesiosi (Zintl e coll., 2003). L'attenuazione di *B. divergens* potrebbe essere ottenuta anche attraverso le colture in vitro su eritrociti, ma finora le prove effettuate non hanno portato risultati soddisfacenti. I bovini potrebbero essere anche trattati con imidocarb qualche giorno prima della vaccinazione (Gray e Gannon, 1992; Gray e coll., 1995; 1989; Lewis e coll., 1981; Purnel e coll., 1980) e questo tipo di approccio abbraccia parzialmente il metodo di controllo di tipo chemioprolattico; tuttavia, anche con questa metodica, i bovini adulti non sono mai completamente protetti (Gray e coll., 1995).

Nei cani la prevenzione nei confronti delle piroplasmosi si basa innanzitutto sul controllo dei vettori, utilizzando prodotti acaricidi per ridurre la possibilità di contatto con le zecche. Anche in questo caso l'argomento è già stato ampiamente discusso nel capitolo precedente.

Sono disponibili vaccini nei confronti di *B. canis*: uno contiene antigeni parassitari ottenuti da coltura omologa di *B. canis*; l'altro contiene oltre a questi anche antigeni derivati da un ceppo di *B. rossi* sud-africano (Moreau e coll., 1989; Schetters, 2005; Schetters e coll., 2009). Entrambi i vaccini inducono una copertura parziale che si manifesta con una sintomatologia più lieve, una minore parassitemia e una minore durata dei segni clinici (Solano-Gallego e Baneth, 2011). Anche per *B. gibsoni* sono presenti studi riguardanti diverse tecniche vaccinali, tra cui anche l'impiego di vaccini a DNA ricombinante (Fukumoto e coll., 2005; 2007; 2009).

Per cavallo e suino non esistono vaccini disponibili nei confronti della piroplasmosi; la prevenzione si basa sul controllo delle infestazioni da zecche, cercando di impedire il contatto tra ospiti e vettori.

### 2.12.2 NELL'UOMO

Per quanto concerne l'uomo, i metodi di profilassi di queste parassitosi si basano su approcci di tipo individuale o comunitario (Hayes e Piesman, 2003; Fish e Childs, 2009). Le singole persone possono prevenire il rischio di contrarre queste infezioni, evitando aree a rischio frequentate dai serbatoi di *Babesia* spp., quali roditori e cervidi, soprattutto nel periodo che va da Maggio a Ottobre, per le nostre latitudini (Stafford III, 2007). I soggetti immunocompromessi, quindi a maggiore rischio di infezione, dovrebbero evitare queste aree.

Sull'ambiente si potrebbero eseguire operazioni volte a ridurre il numero di zecche, come tenere i prati tagliati, eliminare le foglie secche, ridurre il numero di topi o utilizzare piante che non attirano i cervi (Stafford III, 2007).

Altre misure preventive riguardano il controllo del sangue utilizzato nelle trasfusioni i donatori dovrebbero essere monitorati per individuare portatori sani; inoltre i parassiti eventualmente presenti dovrebbero essere inattivati. Queste pratiche però non sono ancora in uso (Grellier e coll., 1997; Zavizion e coll., 2004).

Non sono disponibili informazioni riguardanti l'impiego di farmaci ad uso profilattico dopo la puntura di zecca per prevenire la babesiosi, né è stato messo a punto un vaccino umano (Vannier e Krause, 2009).

# 3

## **ANAPLASMOSI DA *ANAPLASMA* *PHAGOCYTOPHILUM***



### 3.1 CENNI STORICI

*Anaplasma phagocytophilum* è l'agente eziologico di un gruppo di malattie raggruppate come "erlichiosi granulocitiche" (Greig e Armstrong 2006). In passato questo gruppo di patologie era ascrivito a tre agenti eziologici diversi: *Erlichia equi*, *Erlichia phagocytophila* e l'agente dell'Erlichiosi granulocitica umana (HGE), ora rinominati in seguito alla riorganizzazione delle famiglie *Rickettsiaceae* e *Anaplasmataceae* (Dumler e coll., 2001). *A. phagocytophilum*, inizialmente denominato *E. phagocytophila* (Philip, 1974), è stato primariamente definito come agente della febbre da zecche (Tick-borne fever-TBF) nei ruminanti. La prima descrizione di questa patologia risale a Gordon e coll. (1940), otto anni dopo la prima segnalazione di una nuova malattia trasmessa da zecche in Scozia (MacLeod, 1932; Gordon e coll., 1932). Dopo la Scozia sono stati segnalati altri casi di TBF in Regno Unito (Hudson, 1950) Irlanda (Collins e coll., 1970), Scandinavia (Thorshaug, 1940; Overas, 1962; Tuomi, 1967a) e in altre parti d'Europa (Bool and Reinders, 1964; Juste et al., 1989).

Questo patogeno è stato segnalato anche in diverse specie di ruminanti selvatici tra i quali caprioli, renne e camosci in Norvegia (Stuen e coll., 2001; Jenkins e coll., 2001), Slovenia (Petrovec e coll., 2002), Svizzera (Liz e coll., 2002) e Austria (Polin e coll., 2004).

La prima segnalazione di anaplasmosi granulocitica equina (EGA) risale invece al 1969 ad opera di Gribble; successivamente è stata poi segnalata in altre parti degli USA e dell'Europa. Sempre negli Stati Uniti d'America è stata diagnosticata per la prima volta l'anaplasmosi canina (CGA) (Madewell e Gribble, 1982).

Chen e coll. (1994) segnarono negli USA l'anaplasmosi granulocitica umana (HGA), inizialmente definita come erlichiosi granulocitica umana. Dopo questa prima segnalazione sono stati diagnosticati circa 600 casi di HGA (Bakken e Dumler, 2000) e dal 1994 al 2005 il CDC ha riportato più di 2.900 casi in USA (Ismail e coll., 2011). La prima segnalazione umana in Europa risale al 1997 ad opera di Petrovec e coll. in Slovenia. In casi nel nostro continente sono piuttosto sporadici (Blanco e Oteo, 2002).

Successivamente *A. phagocytophilum* è stato riscontrato nel sangue di un gran numero di animali e in diverse specie di zecche, questo suggerisce un'elevata capacità di sfruttare numerosi ospiti e vettori (Bakken e Dumler, 2008; Ohashi e coll., 2005; de la Fuente e coll., 2005; Massung e coll., 2005).

I ceppi responsabili di TBF in Europa sono diversi dai ceppi che causano l'anaplasmosi umana in USA e in certe zone dell'Europa, con diversità relative alla distribuzione, il target di ospiti, le manifestazioni cliniche e la gravità della malattia (Woldehiwet, 2010).

La scoperta di analogie tra HGA, TBF, EGA e l'abilità unica di questi organismi di invadere e replicare nei granulociti, ha posto l'interesse per analisi biomolecolari e biologiche più approfondite (Dumler e coll., 2001). Le tecnologie molecolari hanno permesso di individuare la giusta localizzazione filogenetica per le specie batteriche delle famiglie *Rickettsiaceae*, *Bartonellaceae* e *Anaplasmataceae* all'interno dell'ordine *Rickettsiales*. (Woese e coll., 1990; Weisburg e coll., 1989; Brenner e coll., 1993; Birtles e coll., 1995). L'analisi delle sequenze del 16S rRNA e del gene

GroEL ha permesso la riclassificazione di questi batteri e di evidenziare l'elevata percentuale di similarità tra *E. equi*, *E. phagocytophila* e l'agente dell'HGE (Anderson e coll., 1991; Chen e coll., 1994; Drancourt e Raoult, 1994; Wen e coll., 1995a,b; Dawson e coll., 1996; Sumner e coll., 1997; Zhang e coll., 1997b; Roux e Raoult, 1999) che, associata alle affinità antigeniche sulla base di test di immunofluorescenza indiretta (Dumler e coll., 1995) ha fatto sì che si sia arrivati a disegnare queste tre specie come varianti della stessa specie di *Anaplasma* (Dumler e coll., 2001).

### 3.2 CLASSIFICAZIONE E DESCRIZIONE

Regno: *Bacteria*

Phylum: *Proteobacteria*

Classe: *alpha-Proteobacteria*

Ordine: *Rickettsiales*

Famiglia: *Anaplasmataceae*

Specie: *Anaplasma phagocytophilum*

*Anaplasma phagocytophilum* è una delle quattro specie appartenenti al genere *Anaplasma* della famiglia delle *Anaplasmataceae* che a sua volta comprende anche i generi *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Aegyptianella* e *Wolbachia*, e due generi meno conosciuti “*Candidatus Neoehrlichia*” e “*Candidatus Xenohalictis*”. Questi generi infettano specifici ospiti invertebrati (zecche, insetti, trematodi, nematodi o molluschi) abbondanti in natura (Rikihisa, 2011).

*A. phagocytophilum* è un batterio Gram negativo intracellulare obbligato con localizzazione principalmente nei granulociti (Rikihisa, 1991) e nelle cellule endoteliali (Chen e coll., 1994; Goodman e coll., 1996; Herron e coll., 2005; Rikihisa, 1991; Woldehiwet e Scott, 1982a), non motile e che non produce spore o altre forme di resistenza (Dumler e coll., 2005). Questi batteri sono pleomorfici, ma solitamente si presentano in forma coccoide o ellissoidale di 0.3-0.4 µm di diametro. Nei granulociti replicano formando microcolonie o morule all'interno di vacuoli intracitoplasmatici (Rikihisa, 1991; Popov e coll., 1995). All'interno dei vacuoli i batteri possono presentarsi impaccati in seguito ad una perdita di lipopolisaccaridi e peptidoglicani (Lin e Rikihisa, 2003). Questa perdita permette uno schiacciamento del batterio all'interno del vacuolo per mantenere la plasticità del granulocita richiesta per il circolo sanguigno (Rikihisa, 2011). Negli strisci di sangue, allestiti con la metodica Giemsa-Romanowsky, gli inclusi citoplasmatici si presentano di colore dal blu scuro al viola (Rar e Golovljova, 2011) e sono di dimensioni comprese tra 0.3 e 2.5 µm. Le morule e i vacuoli possono essere di varie dimensioni tra 1.5 e 2.5 µm di diametro, ma possono arrivare anche a 6 µm (Foggie, 1951; Popov e coll., 1998) e sono sospese in una matrice non-fibrillare (Dumler e coll., 2005). Nella forma intracellulare possono presentarsi come piccole e dense strutture (*dense-core* o DC) di 0.4-0.6 µm, con cromatina addensata, o come corpi reticolari (RC) da 0.4-0.6 a 0.7-1.9 µm che presentano filamenti nucleoidi dispersi e ribosomi (Popov e coll., 1995; Ismail e coll., 2010; Tuomi e von Bonsdorff, 1966; Woldehiwet e Scott, 1982). Entrambe le forme si dividono per fissione binaria (Woldehiwet e Scott, 1982) e presentano la parete cellulare gram-negativa con una membrana interna liscia e una esterna ondulata (Popov e coll., 1995). Studi effettuati *in vitro* hanno evidenziato che

la forma densa è predominante nelle prime 24 ore post infezione, suggerendo che questa forma sia correlata con le fasi di adesione ed internalizzazione del batterio. Dopo 48 ore la forma predominante è quella reticolare, mentre dopo 72 ore dall'infezione la forma reticolare si evolve in forme dense che verranno poi rilasciate per iniziare un nuovo ciclo replicativo (Ohashi e coll., 1998; Zhang e coll., 2007). Alcuni autori sostengono che la forma reticolare è caratteristica dello stadio vegetativo, mentre quella densa è tipica dello stadio latente (Rar e Golovljova, 2011).

All'osservazione con il microscopio elettronico l'ultrastruttura dell'involucro cellulare rivela la presenza di foglietti interni ed esterni simili a quelli dei batteri Gram-negativi (Popov e coll., 1998). La struttura interna viene visualizzata facilmente e consiste in filamenti di cromatina e ribosomi. Le due forme cellulari sono ben osservabili e anche la disposizione della cromatina è facilmente riconoscibile. La forma reticolare, con cromatina addensata in posizione centrale o eccentrica è in genere identificata *in vivo*, mentre quella densa, in cui si evidenziano filamenti omogenei di matrice cromatinica, si osserva principalmente durante la propagazione *in vitro*. Come già accennato, entrambe le forme si dividono per scissione binaria, suggerendo che un ciclo di sviluppo associato a queste morfologie sia improbabile. Le diverse specie di *Anaplasma*, infatti, possono produrre abbondante membrana che all'occorrenza si avvolge attorno alle cellule individuali o invagina all'interno delle stesse. Negli spazi vacuolari di *Anaplasma*, al contrario di quanto succede nel genere *Ehrlichia*, manca la matrice fibrillare (Dumler e coll., 2005).

Culture *in vitro* di varianti umane di *A. phagocytophilum* sono state ottenute con successo su colture primarie di neutrofili umani e in linee cellulari mielogene umane e non umane (HL-60, THP-1, M1) (Goodman e coll., 1996). Anche in colture cellulari ottenute da tessuti embrionali della zecca *Ixodes scapularis* (IDE8 e ISE6) è stato possibile coltivare questo patogeno (Munderloh e coll., 1996a; b; 1999). Anche le varianti responsabili di TBF sono state coltivate su linee cellulari da zecca (Woldehiwet e coll., 2002; Woldehiwet e Horrocks, 2005). Nessuna specie di *Anaplasma* è mai stata coltivata su terreni senza cellule. In coltura l'infezione inizialmente si presenta con pochi batteri all'interno dei vacuoli definiti corpi iniziali. Con la divisione binaria le colonie intra-vacuolari aumentano di dimensioni e si parla quindi di corpi intermedi o morule, a seconda delle dimensioni. In una singola cellula possono essere presenti diversi vacuoli, probabilmente derivati dalla fusione di endosomi infetti.

Lo sviluppo delle colture cellulari ha facilitato gli studi relativi al meccanismo di adesione e ai recettori cellulari dell'organismo (Goodman e coll., 1999; Herron e coll., 2000), come anche la messa a punto di reagenti da utilizzare negli studi di espressione antigenica nei mammiferi e nei vettori (Jauron e coll., 2001; Woldehiwet e Horrocks, 2005).

Il genoma di questo batterio è abbastanza piccolo (0.8-1.5 Mb) ed è già stato completamente sequenziato (Dunning Hotopp e coll., 2006). Nel corso dei processi evolutivi la perdita di geni ridondanti ha determinato la dipendenza dello stesso dalle cellule dell'ospite per esplicitare funzioni fondamentali (Dunning Hotopp e coll., 2006). Il genoma è caratterizzato da un unico cromosoma circolare e da un operone di RNA ribosomiale, nel quale è localizzato il 16S rRNA, separatamente dal 23S-5S rRNA (Dunning Hotopp e coll., 2006).

Attraverso l'analisi delle sequenze del 16S rRNA e dell'operone groESL, il genere

*Anaplasma* forma un clade distinto da *Ehrlichia*, *Wolbachia*, *Neorickettsia*, *Rickettsia* e *Orientia* tra gli Alfa-proteobatteri, all'interno dell'ordine delle *Rickettsiales* (Dumler e coll., 2005).

Questo batterio presenta una parete cellulare con le caratteristiche dei Gram negativi, ma mancano importanti componenti della membrana cellulare tra i lipopolisaccaridi e i peptidoglicani (Lin e Rikihisa, 2003). La parete cellulare è però ricca di colesterolo, che il batterio assume dalle cellule ospiti e sembra essere sfruttato per la sopravvivenza e per l'ingresso nelle cellule stesse. Studi recenti hanno dimostrato che *A. phagocytophilum* sfrutta il colesterolo delle cellule dell'ospite derivato dal metabolismo e dal sistema di regolazione dell'LDLR (Low density lipoprotein receptor) per accumulare il colesterolo nei propri inclusi e facilitare così la replicazione (Xiong e coll., 2009). In aggiunta a questo ruolo del colesterolo, sembra che la parete cellulare ricca di colesterolo funzioni anche da ligando per la stimolazione di risposte immunitarie innate e acquisite (Ismail e coll., 2010).

*A. phagocytophilum* presenta proteine di membrana immunodominanti, membre della famiglia Pfam PF01617 che costituiscono la famiglia OMP-1/MSP2/P44 (Yu e coll., 1997; Ohashi e coll., 1998; Zhi e coll., 1999; Yu e coll. 2000a; b; Caspersen e coll., 2002; Ijdo e coll., 2002; Park e coll., 2003; Huang e coll., 2008). Il genoma presenta tre omp-1, un msp2 e due msp2 omologhi, un msp4 e 113 loci p44 appartenenti a questa famiglia di proteine (Ijdo e coll., 2002; Peddireddi e coll., 2009). La proteina P44 è implicata nella fase di adesione tra il batterio e la superficie dei neutrofili e in variazioni antigeniche e evasioni della risposta immunitaria dell'ospite. Esistono diverse p44 (p44-1 fino a p44-65) espresse sia nei mammiferi che nelle zecche e conferiscono adattamenti antigenici ambientali ed efficienza di trasmissione del patogeno alla zecca (Ijdo e coll., 2002; Zhi e coll., 1999; Caspersen e coll., 2002; Peddireddi e coll., 2009; Dunning Hotopp e coll., 2006).

*Anaplasma* presenta anche geni per i sistemi di secrezione di tipo IV, che sono strutture che utilizzano un complesso di proteine transmembrana e un pilo per mediare la traslocazione tra i ripiegamenti cellulari sia nei batteri Gram positivi sia nei Gram negativi (Christie e coll. 2005; Ohashi e coll., 2002; Dumler, 2005). Il substrato Ank A di questo tipo di secrezione è stato identificato. *Anaplasma* induce la fosforilazione della tirosina di una proteina di 160 KDa dell'ospite (ROCK1) attraverso l'interazione con le sue cellule (Lin e Rikihisa, 2004) e indirettamente induce la fosforilazione dell'AnkA (Ijdo e coll., 2007; Thomas e Fikrig, 2007). Questo processo è necessario al batterio per entrare nella cellula e proliferare come dimostrato attraverso l'utilizzo di un inibitore della tirosina ad ampio spettro (Yoshiie e coll., 2000; Mott e coll., 2002; Lin and Rikihisa, 2003; 2004). Dopo la traslocazione, le tirosina-kinasi dell'ospite (Src e Abl) inducono la fosforilazione dell'AnkA; dopo questa fase AnkA si lega alla fosfatasi dell'ospite (SHP-1) (Ijdo e coll., 2007). AnkA è una proteina unica di *Anaplasma* con peso molecolare elevato (160 kDa), non associata alla membrana ma riscontrabile nel nucleo dei granulociti infetti dell'ospite, presumibilmente dopo la secrezione e il passaggio attraverso almeno 3 membrane (Caturegli e coll., 2000). Diversi studi hanno ipotizzato un ruolo fondamentale di AnkA nell'infezione, in quanto sembra cruciale l'interazione di questa proteina con l'Abl-1 per poter evadere la risposta immunitaria dell'ospite (Rikihisa e Lin, 2010).

### 3.3 CICLO BIOLOGICO

Il ciclo biologico di *A. phagocytophilum* comprende fasi riproduttive che avvengono sia nei vettori, zecche Ixodidae, sia negli ospiti vertebrati (Rikihisa, 1991). Questo batterio è in grado di determinare un'infezione permanente negli animali vertebrati, rendendoli così possibili serbatoi della malattia. Esistono diversi ceppi di *A. phagocytophilum* derivati dai diversi agenti di malattia precedentemente classificati come *Ehrlichia phagocytophila*, *E. equi* e HGE; la suscettibilità dei mammiferi ai vari ceppi è variabile. L'uomo ad esempio è sensibile solo a pochi ceppi ed è considerato un ospite a fondo cieco, infatti normalmente non rientra nel ciclo biologico. Il ceppo umano in Europa è lo stesso che causa malattia anche in cani e gatti.

#### 3.3.1 CICLO ALL'INTERNO DELLA ZECCA

Nelle zecche il batterio si trasmette per via trans-stadiale da larve a ninfe e da ninfe ad adulti. Attraverso il pasto di sangue, le zecche si infettano e, nello stadio successivo, possono trasmettere il patogeno ad un altro mammifero (Paddock e Childs, 2003). Non si sa molto del comportamento di *A. phagocytophilum* all'interno della zecca: ad esempio quanto duri la permanenza nei vacuoli cellulari dopo il pasto di sangue, quando arrivi nelle ghiandole salivari e come si protegge durante le fasi di assunzione di sangue e trasmissione all'ospite (Foley e Nieto, 2006). Dopo essere stato assunto dalla zecca, il batterio migra dall'intestino e va a colonizzare gli acini secretori delle ghiandole salivari (Hodzic e coll., 1998a) e qui permane anche nelle fasi di muta tra uno stadio e l'altro. Quando la zecca infetta assume un nuovo pasto di sangue, il batterio inizia a replicare all'interno delle ghiandole ed esce, principalmente attraverso la saliva, per infettare l'ospite mammifero e invadere i neutrofili per completare il ciclo (Liu e coll., 2011). Quando una zecca si alimenta su un ospite infetto, i batteri contenuti nei neutrofili raggiungono l'intestino assieme al pasto di sangue e infettano le ghiandole salivari entro le 24 ore dal pasto (Hodzic e coll., 1998a). Il meccanismo con cui questo patogeno migra dall'intestino alle ghiandole salivari non è chiaro. Liu e coll (2011) sostengono che la proteina salivare P11 favorisce l'infezione degli emociti della zecca, e sembra essere un passaggio fondamentale per la successiva infezione delle ghiandole salivari. In un altro studio è stato dimostrato che una proteina salivare della zecca *I. scapularis*, Salp16, è fondamentale per la sopravvivenza di *A. phagocytophilum* all'interno delle ghiandole salivari (Sukumaran e coll., 2006).

Altri studi evidenziano come nelle zecche che non si sono ancora alimentate la concentrazione di questo patogeno a livello di ghiandole salivari sia bassa, mentre nella fase immediatamente precedente il pasto sembra che si attui una notevole replicazione del batterio. In un altro studio, su un gruppo di ninfe infettate sperimentalmente, si è visto che nelle fasi in cui non si alimentavano le ghiandole di una sola ninfa presentavano positività alla PCR per *A. phagocytophilum*, mentre dopo il prefeeding il 35% delle ghiandole estratte da queste zecche risultava positivo e infettante per inoculazione sul topo (Telford III e coll., 1996). In Giappone uno studio ha rilevato che il 32% di campioni di ghiandole salivari ottenuti zecche *I.*

*persulcatus* e *I. ovatus* raccolte dall'ambiente era positivo alla PCR (Ohashi e coll., 2005); mentre in *I. ricinus* le percentuali di positività variavano da 0,5 a 2,0 % in funzione della tecnica utilizzata, stato di nutrizione e stadio della zecca (Alberdi e coll., 1998). Questi dati suggeriscono che possano esserci notevoli variabilità geografiche nel tasso di positività di questo batterio nelle zecche; gli effetti del prefeeding sembrano comunque indicare che nelle zecche raccolte dall'ambiente la carica infettante nel tessuto salivare sia basso (Foley e Nieto, 2006).

### 3.3.2 CICLO NELL'OSPITE VERTEBRATO

Nei neutrofili, come anche all'interno della zecca, *A. phagocytophilum* si presenta, come già accennato, in due morfotipi (reticolare e denso) (Munderloh e coll., 1999; Popov e coll., 1998; Troese e Carlyon, 2009). Nel circolo ematico il batterio è presente principalmente in neutrofili maturi, piuttosto che nei tessuti periferici, compreso il tessuto ematopoietico (Bayard-McNeeley e coll., 2004; Hodzic e coll., 2001; Xiong e coll., 2007), tuttavia può infettare i precursori midollari e le cellule endoteliali (Klein e coll., 1997a; Herron e coll., 2005). In seguito al legame con i recettori di membrana il batterio entra nei neutrofili per endocitosi e viene incorporato in fagosomi. *A. phagocytophilum* inibisce la fusione tra fagosomi e lisosomi, blocca il complesso enzimatico NADPH e inibisce l'apoptosi cellulare (Banerjee e coll., 2000; Fox, 2000; Mott e Rikihisa, 2000; Wang e coll., 2002). Attraverso questi meccanismi il batterio previene la sua eliminazione da parte dei linfociti (Greig e Armstrong, 2006).

Gli studi di invasione cellulare sono stati effettuati attraverso la microscopia elettronica applicata a neutrofili infetti di pecora (Woldehiwet e Scott, 1982a). Questo tipo di analisi ha permesso di capire che solo le forme dense si legano alle cellule HL-60 (Troese e Carlyon, 2009), ma sia le forme dense che quelle reticolari sono in grado di legarsi e penetrare nelle linee cellulari di zecca ISE6 (Munderloh e coll., 1999). Troese e Carlyon (2009) riportano che la forma densa è una fase di transizione prima della forma reticolare e rimane per circa 12 ore, la forma reticolare inizia quindi la fase di replicazione. Nel giro di 24 ore negli inclusi citoplasmatici sono già visibili abbondanti batteri e a 36 ore inizia la reinfezione della stessa cellula; in questa fase si osserva la presenza di entrambi i morfotipi batterici.

L'immunofluorescenza ha evidenziato che solo le forme dense, di dimensioni < 1 µm, si legano ed entrano nei neutrofili circolanti (Niu e coll., 2006); in coltura su cellule HL-60, invece, entrambe le forme riescono ad entrare. In questo substrato, la maggior parte delle forme reticolari viene velocemente trasportata ai compartimenti LAMP1 (lysosome-associated membrane protein 1), suggerendo che fasi diverse del batterio presentano caratteristiche biologiche e di superficie diverse che permettono allo stesso di entrare nelle cellule dell'ospite attraverso recettori diversi. Ad eccezione del sistema di secrezione tipo IV e del VirB9 i marker molecolari che distinguono le forme DC dalle RC non sono ancora stati individuati (Niu e coll., 2006).

Nell'uomo non sono segnalate lesioni cutanee in corso di HGA, invece negli agnelli, in condizioni di campo, il batterio viene riscontrato primariamente in associazione ai neutrofili e macrofagi delle lesioni cutanee, suggerendo un ruolo importante dei leucociti periferici nelle fasi di trasmissione dalla zecca (Granquist e coll., 2010b).

### 3.4 ECOLOGIA ED EPIDEMIOLOGIA

*Anaplasma phagocytophilum* è trasmesso primariamente da zecche appartenenti al complesso *Ixodes persulcatus*; queste specie sono caratteristiche dell'emisfero settentrionale (Woldehiwet, 2010). In Europa il vettore principale è *Ixodes ricinus*, segnalato da diversi gruppi di lavoro attraverso l'impiego di tecniche molecolari (Ogden e coll., 1998a; Liz e coll., 2000; von Loewenich e coll., 2003; Katargina e coll., 2011) in questo vettore il batterio può sopravvivere fino ad un anno, nell'attesa che la zecca si alimenti su un nuovo ospite (MacLeod e Gordon, 1933; MacLeod, 1936). Questi stessi studiosi ipotizzarono inoltre che *Haemophysalis punctata* potesse essere un altro possibile vettore della malattia in certe zone dell'Inghilterra, dove *I. ricinus* non è segnalata (MacLeod, 1962). Questo patogeno è stato segnalato in *I. persulcatus* in Russia (Eremeeva e coll., 2006; Rar e coll., 2010; Shpynov e coll., 2006), in Cina (Cao e coll., 2003), Giappone (Ohashi e coll., 2005) e in Korea (Kim e coll., 2006). Ci sono segnalazioni di *A. phagocytophilum* in *Dermacentor silvarum* in Cina (Cao e coll., 2006), in *I. ovatus* in Giappone, in *I. trianguliceps* in Inghilterra (Bown e coll., 2003) e in *I. ventalloi* in Portogallo (Santos e coll., 2004). Sia *I. ventalloi* che *I. trianguliceps* possono mantenere il batterio in natura ma queste zecche, essendo di attitudine nidicola, difficilmente possono partecipare alla trasmissione del patogeno all'uomo o agli animali più grandi (Rar e Golovljova, 2011).

Altri studi hanno dimostrato la presenza del batterio in *I. persulcatus*: Alekseev e coll. (2001) riportano dati relativi alle regioni Baltiche della Russia, mentre Cao e coll. (2000) segnalano il batterio in una regione della Cina già enedemica per la malattia di Lyme.

Negli USA l'infezione è trasmessa nella zona orientale e medio-occidentale da *I. scapularis* (Telford e coll., 1996; Levin e Fish, 2001), mentre nella parte occidentale è veicolata da *I. pacificus* e da *I. spinipalpis* (Richter e coll., 1996; Barlough e coll., 1996; 1997; Burkot e coll., 2001). Uno studio sperimentale ha dimostrato che le ninfe di *I. pacificus* sono vettori molto più efficienti rispetto alle ninfe di *I. scapularis* e l'isolato Webster si trasmette più facilmente rispetto all'MRK (Teglas e Foley, 2006). In relazione alla distribuzione delle zecche, la maggior parte dei casi umani sono localizzati nelle zone nord-orientali e medio-occidentali degli USA, mentre molti dei casi segnalati in cavalli provengono dalla parte occidentale, in California (Rikihisa, 2006b).

La prevalenza di infezione da *A. phagocytophilum* nelle zecche è in genere superiore negli USA. Nella parte settentrionale il range di infezione in *I. scapularis* è compreso tra 7,6 e 53% negli adulti e 1.5-20.6 % nelle ninfe (Telford e coll., 1996). In genere la prevalenza in *I. ricinus* e *I. persulcatus* varia da 1 a 5% (Alekeseev e coll., 2001; Liz e coll., 2000; Katargina e coll., 2011; Ogden e coll., 1998; Cao e coll., 2003; Ohashi e coll., 2005; Rar e coll., 2010; Shpynov e coll., 2006); in rari casi sono state riscontrate percentuali di infezione superiori in Norvegia, 17%, (Rosef e coll., 2009) e in Italia, 24%, (Cinco e coll., 1997). Le zecche raccolte in diversi momenti, anche nella stessa località, possono presentare prevalenze di infezione diverse (Massung e coll., 2002b); queste variazioni sembrano riflettere variazioni stagionali e annuali, i diversi metodi di campionamento e le diverse metodiche analitiche (Katargina e coll., 2011). Un confronto tra prevalenze tra diversi paesi

deve quindi essere considerato con cautela (Rar e Golovljova, 2011).

Le specie di mammiferi ospiti di *A. phagocytophilum* variano in funzione della localizzazione geografica, comprendendo piccoli roditori come tamie, topi, scoiattoli ma anche cervidi e alcuni uccelli.

Nella parte orientale e medio-occidentale degli Stati Uniti i serbatoi riconosciuti sono il topo dai piedi bianchi (*Peromyscus leucopus*), la tamia striata (*Tamias striatus*) (Telford e coll., 1996; Walls e coll., 1997) e il cervo dalla coda bianca (*Odocoileus virginianus*) (Ravyn e coll., 2001). Ceppi di *Anaplasma* con ospiti differenti possono circolare nelle stesse aree, ad esempio *I. persulcatus* può veicolare sia il ceppo patogeno per l'uomo Ap-ha, sia la variante non patogena Ap-variant 1 (Courtney e coll., 2003). Questi due ceppi differiscono per due nucleotidi nel 16S rRNA e in un gene per una proteina maggiore di superficie (Courtney e coll., 2003; de la Fuente e coll., 2005). In ambiente selvatico Ap-variant 1 è associato al cervo dalla coda bianca (Massung e coll., 2005) ed è in grado di trasmettere sperimentalmente l'infezione altri cervi dalla coda bianca e le capre, ma non i roditori (Massung e coll., 2003; 2006; Reichard e coll., 2009). Il ceppo che infetta l'uomo, invece, può infettare i roditori ma non il cervo (Reichard e coll., 2009).

Nella parte occidentale degli USA invece scoiattoli grigi (*Sciurus griseus*), ratto del legno (*Neotoma fuscipes*) e tamie (*Tamias senex*) sono i principali reservoir della malattia (Foley e coll., 2002; 2004). La sieroprevalenza in *N. fuscipes* varia dal 17 all'80% (Nicholson e coll., 1999; Foley e coll., 2002; Drazenovich e coll., 2006). In uno studio di tipo sierologico condotto da Foley e coll., (2008) su diverse specie di roditori, le tamie (*Tamias senex*) hanno presentato 4.8% di positività; i ratti del legno il 28%, gli scoiattoli grigi l'85,7%, gli scoiattoli volanti (*Glaucomys sabrinus*) il 14,3%, degli scoiattoli Douglas (*Tamiasciurus douglasii*) il 40%. In totale il tasso di positività tra tutti i roditori è risultato essere del 14.5%. Successivamente è stato dimostrato che anche la tamia delle sequoie (*Tamias ochrogenys*) è un serbatoio competente per *A. phagocytophilum*, in quanto si infettano facilmente con il ceppo MRK e possono trasmettere l'infezione, attraverso *I. pacificus*, ai topi (Nieto e Foley, 2009). Sembra comunque che i ceppi circolanti tra i roditori, in particolare quelli dei ratti del legno, non causino infezione nei cavalli (Foley e coll., 2008); mentre i ceppi correlati alle tamie riescono ad infettare sia i topi che i cavalli (Rar e Golovljova, 2011). Le infezioni nel cavallo causate dal ceppo della tamia sono indistinguibili da quelle causate dal ceppo di origine umana (Foley e coll., 2009). I ceppi del woodrat sono geneticamente diversi nel gene msp2 rispetto ad altri ceppi americani di cane, uomo e orso (Foley e coll., 2008). Questo suggerisce la presenza di molte varianti con diverso tropismo d'ospite negli USA. Ap-variant 1 infetta i ruminanti ma non i roditori, il ceppo del ratto del legno è specifico per questa stessa specie animale, mentre i ceppi di scoiattoli e topo dai piedi bianchi sono patogeni per una grande varietà di animali come roditori, cavalli, uomo e cani (Foley e coll., 2009).

Altri animali selvatici possono fungere da ospiti come ad esempio il puma e il coyote, ma in genere hanno un ruolo di sentinelle di infezione, in quanto non sviluppano infezioni croniche (Foley e coll., 2004). Anche il procione può essere sensibile all'infezione: il ceppo Ap-ha causa infezioni croniche, mentre Ap-variant 1 solamente infezioni brevi (Yabsley e coll., 2008).

Anche nei rettili è stata segnalata l'infezione da *A. phagocytophilum*. Nieto e coll. (2009) hanno valutato la presenza del patogeno in diverse specie di lucertole e di serpenti in California. Nelle lucertole è stata riscontrata una prevalenza del 10%, sia



sierologica che molecolare; i serpenti hanno mostrato una positività del 5% ai test sierologici e del 11,7% alla PCR. L'analisi della sequenza del gene GroEL, ottenuto da un serpente, ha mostrato un'analogia del 100% con il ceppo derivato dall'uomo. Gli stessi autori hanno anche dimostrato la possibilità di effettuare infezioni sperimentali nelle lucertole utilizzando zecche infette.

Uomini e cani sono ospiti in genere accidentali, la batteriemia è di breve durata e in genere non sono coinvolti nell'infezione ad altri ospiti (Bakken e Dumler, 2008).

L'infezione nel bovino è rara negli Stati Uniti, ma è comune in Europa. Prove di infezione sperimentale con il ceppo equino MRK su bovini sono fallite (Pusterla e coll., 2001), confermando che il ceppo Californiano equino non ha tropismo per i ruminanti.

In Europa l'anaplasmosi ha importanza principalmente nel settore veterinario, sono infatti segnalati numerosi casi di febbre da zecche in pecore, bovini, capre e cavalli (Rar e Golovljova, 2011).

In Norvegia si riconoscono centinaia di casi in ovini e bovini (Stuen e coll., 2006b); in Regno Unito, in uno studio, è stata riscontrata una positività nelle pecore del 38% (Ogden e coll., 2002a). La pecora sembra essere un efficiente serbatoio di infezione nelle fasi acute e post-acute della malattia (Ogden e coll., 1998a; 2003). Nelle pecore circolano 5 varianti di questo batterio (Stuen e coll., 2002). I due ceppi più frequenti causano infezioni persistenti negli agnelli che possono durare anche 6 mesi, caratterizzate da stati di batteriemia ciclici. (Granquist e coll., 2010a).

Tra le specie selvatiche diversi mammiferi possono fungere da serbatoio: cervidi come il capriolo (*Capreolus capreolus*), il cervo (*Cervus elaphus*) e il camoscio (*Rupicapra rupicapra*) (Liz e coll. 2002). In Slovenia è stata riscontrata un'elevata prevalenza di infezione nei caprioli: 941% all'esame sierologico e più dell'85% alla diagnosi molecolare, dato, quest'ultimo riscontrato, anche nei cervi (Petrovec e coll., 2002). Inoltre è stato anche segnalato il decesso di un giovane capriolo in Norvegia, ritrovato in condizioni di paresi e fortemente infestato da zecche *I. ricinus* (Stuen e coll., 2006a). *A. phagocytophilum* è stato segnalato anche in daini (*Dama dama*) in Regno Unito (Mc Diarmid e coll., 1965) e alci (*Alces alces*) (Stuen e coll., 2001). Altri stati Europei in cui è segnalato sono: Svizzera nei camosci (Petrovec e coll., 2002); in Austria sempre nei camosci e in altri ruminanti selvatici (cervi, caprioli, capre ibex e mufloni) (Polin e coll., 2004; Silaghi e coll. 2011a); in Slovacchia e Repubblica Ceca in piccoli ruminanti (Derdáková e coll., 2011); in cani in Slovenia (Ravnik e coll., 2009).

Attraverso le analisi molecolari *A. phagocytophilum* è stato ritrovato in molte specie di piccoli mammiferi: arvicole (*Myodes glareolus*, *Microtus arvalis*, *Mi. Agrestis* e *Mi. oeconomus*); topi (*Apodemus sylvaticus* e *Ap. Flavicollis*) e nel toporagno (*Sorex araneus*) (Bown e coll., 2003; Grzeszczuk e coll., 2006; Hartelt e coll., 2008; Liz e coll., 2000). La prevalenza di infezione nelle arvicole sembra essere superiore a quella riscontrata nei topi, ad esempio in uno studio in Svizzera sono risultate positive il 19,2% delle arvicole contro il 2,9-4,2% dei topi (Liz e coll., 2000), mentre in Germania le arvicole positive erano il 13,4% e i topi solamente lo 0,5% (Hartelt e coll., 2008).

Nelle aree in cui è maggiormente diffusa *I. persulcatus*, ad esempio in Russia, *A. phagocytophilum* è stato ritrovato principalmente in piccoli roditori: arvicole (*Myodes* spp. e *Microtus rossiaemeridionalis*), nel toporagno comune, nel topo Koreano (*Apodemus peninsulae*) nella tamia siberiana (*Tamias sibiricus*) (Rar e coll., 2011;

Telford e coll., 2002). Le larve e le ninfe di questa zecca sono molto importanti per il ciclo del batterio, quindi alimentandosi su questi piccoli mammiferi li rendono possibili serbatoi (Rar e Golovljova, 2011).

Questo patogeno è stato isolato anche nella zona di Istanbul e in una regione nord-occidentale della Turchia in zecche *I. ricinus* (Sen e coll., 2011).

In Cina *A. phagocytophilum* è stato segnalato in topi di campo (*Apodemus* spp.), in criceti dalla coda lunga (*Tscheskia triton*), in tamie siberiane, in diverse specie di ratti (*Rattus* spp. e *Niviventer* spp.) come anche nelle pecore (Cao e coll., 2006; Zhan e coll., 2008; 2010). In Corea si hanno segnalazioni in arvicole (*Ap. Agrarius*) e in insettivori (*Crocidura lasiura*) (Kim e coll., 2006).

L'incidenza e la gravità delle infezioni è variabile a seconda delle aree; la variabilità è dovuta al ceppo di *A. phagocytophilum* circolante, dai serbatoi e dalla presenza delle zecche vettrici (Tuomi e coll., 1967b; Ogden e coll., 2002b; Teglas e Foley, 2006).

Molti casi di TBF si sono verificati a seguito dell'introduzione di bestiame in pascoli infestati da zecche, anche se epidemie sporadiche sono state segnalate nelle capre (Gray e coll., 1988). Fino al riconoscimento dei roditori come reservoir delle varianti di questo patogeno, si pensava che la malattia fosse mantenuta da un ciclo zecca-ruminante, con infezioni persistenti nei ruminanti selvatici e domestici (MacLeod, 1936).

Il primo caso di una malattia simile a TBF nei cavalli è stato segnalato nel 1969 in California (Gribble, 1969). All'inizio l'agente eziologico fu chiamato *Ehrlichia equi*. Altri casi di erlichiosi granulocitica nel cavallo furono diagnosticati in Florida (Brewer e coll., 1984), Colorado (Madigan, 1993), New Jersey (Ziemer e coll., 1987) e Connecticut (Madigan e coll., 1996); l'aspetto clinico era caratterizzato da febbre alta, depressione, edema alle estremità, petecchie e riluttanza a muoversi (Gribble, 1969; Madigan e Gribble, 1987; Madigan, 1993). In Europa l'infezione nei cavalli è stata segnalata in Scandinavia (Engvall e Egenvall, 2002), Svizzera (Pusterla e coll., 1998; Silaghi e coll., 2011), Regno Unito (McNamee e coll., 1989; Korbutiak e Schneiders, 1994; Shaw e coll., 2001). L'infezione nei cavalli è stata riscontrata anche in Guatemala (Teglas e coll., 2005).

Nel cane le infezioni sostenute da *A. phagocytophilum* hanno varie localizzazioni geografiche: diversi autori le hanno segnalate negli USA (Bowman e coll., 2009), in Scandinavia (Egenvall e coll., 1997), in Germania (Jensen e coll., 2007; Kohn e coll., 2010), in Svizzera (Pusterla e coll., 1998), in Francia (Pantchev e coll., 2009), in Regno Unito (Shaw e coll., 2001), in Slovenia (Ravnik e coll., 2011); in Spagna (Solano-Gallego e coll., 2006; Amusategui e coll., 2008), in Portogallo (Santos e coll., 2009), a Cipro (Chochlakis e coll., 2009) in Tunisia (M'Ghirbi e coll., 2009) e in Israele (Levi e coll., 2006). Nell'emisfero meridionale non sono ancora stati segnalati casi di anaplasmosi (Carrade e coll., 2009). I dati di prevalenza nel cane sono influenzati dallo stato di salute del cane, dal sospetto clinico e dalla distribuzione geografica di ospiti e vettori. Non va sottovalutato che ai test sierologici *A. phagocytophilum* cross-reagisce con *A. platys*, quindi i dati di positività potrebbero non essere attendibili (Carrade e coll., 2009). Un recente studio effettuato negli Stati Uniti su 400 mila cani, utilizzando un kit ELISA commerciale, ha rilevato notevoli variazioni di siero-prevalenza con picchi superiori al 40% in certe contee della parte settentrionale del paese (medio-occidentali e nord-orientali) quando la prevalenza complessiva di queste regioni si aggirava su livelli molto più bassi (6,7 e 5,5

rispettivamente) (Bowman e coll., 2009). Anche lo studio francese ha riportato dati di prevalenza sierologica del 2,7%, risultato però che potrebbe essere falsato da possibili cross-reazioni con *A. platys* (Pantchev e coll., 2009). In uno studio tedesco, invece, i cani sono stati testati contemporaneamente con IFAT, PCR e striscio di sangue per individuare le morulae nei granulociti. I risultati dimostrano che la positività sierologica in cani positivi e sani o cani malati non presenta differenze significative; i cani sono risultati positivi alla PCR principalmente nel periodo maggio-settembre, indicando una stagionalità di infezione; inoltre i parametri ematici di cani sani, di cani sieropositivi e di cani positivi a PCR e presenza di morulae, non presentavano sostanziali differenze, suggerendo quindi che sono necessarie analisi di tipo molecolare per i cani deputati alla donazione di sangue per minimizzare il rischio di trasmissione (Kohn e coll., 2008). In uno studio condotto in Slovenia (Ravnik e coll., 2011) sono state messi in relazione alterazioni ematologiche, biochimiche e cliniche con la diagnosi attraverso IFAT e PCR. Anche in questo caso si presentano dati discordanti tra IFAT e PCR e i segni clinici riscontrati nei cani potrebbero non essere dovuti esclusivamente ad anaplasmosi. Gli autori suggeriscono quindi l'importanza di individuare nuovi strumenti diagnostici per questa malattia.

Infezioni da *A. phagocytophilum* sono state segnalate anche nei gatti in Svizzera (Schaarschmidt-Kiener e coll., 2009), in Finlandia (Heikkilä e coll., 2010), negli USA (Magnarelli e coll., 2005).

In Italia infezioni sostenute da *A. phagocytophilum* sono state segnalate in diverse zone del paese e in diverse specie animali. Ebani e coll. (2007; 2008) riportano dati relativi alla sieroprevalenza in diverse specie domestiche e selvatiche analizzate in centro Italia: daini, cervi, cavalli, bovini, pecore, capre e cani, con valori compresi tra il 46% nei ruminanti selvatici e il 4% nelle capre. I dati emersi riguardo i ruminanti selvatici, suggeriscono un possibile ruolo di serbatoio di queste due specie nell'area oggetto di studio. Altri autori hanno eseguito un'indagine nei cavalli in Italia centrale, ottenendo una prevalenza sierologica del 17% e una prevalenza molecolare dell'8% (Passamonti e coll., 2008). Infezioni sostenute da *A. phagocytophilum* sono state segnalate anche nelle volpi (Ebani e coll., 2011). Un quadro della diffusione delle malattie trasmesse da artropodi in Italia (Vector-Borne Diseases VBD) in cani e gatti, è stato esposto da Otranto e Dantas-Torres (2010), che hanno segnalato casi di anaplasmosi principalmente nel centro e sud dell'Italia. La prevalenza di questo patogeno è stata indagata anche in Sicilia nelle zecche e in diverse specie animali (Torina e coll., 2008; 2010) tra cui una pecora soggetta ad aborto (Giudice e coll., 2011). Al Nord questa infezione è stata segnalata nei caprioli (Carpi e coll., 2009); in questo studio era stata dimostrata la capacità di questi ruminanti di trasmettere l'infezione alle larve di *I. ricinus*. In Emilia Romagna è stata analizzata una popolazione di daini del Bosco della Mesola (Ferrara) e 20 soggetti su 72 sono risultati positivi ad *A. phagocytophilum* attraverso indagini sierologiche, 11 dei 72 animali hanno mostrato positività anche alla PCR (Veronesi e coll., 2011).

### 3.5 PATOGENESI

Il tempo minimo di alimentazione della zecca per trasmettere *A. phagocytophilum*

all'ospite sensibile va dalle 24 alle 48 ore (Katavolos e coll., 1998; de Vignes 2001). Il periodo di incubazione dura circa 1-2 settimane; nel cavallo il tempo di incubazione medio è di 10,5 giorni (Pusterla e coll., 1999a). In vitro si è visto che il batterio infetta i progenitori di granulociti e monociti ma i neutrofili più differenziati sono le cellule più suscettibili (Kim e coll., 2002). Studi effettuati utilizzando granulociti umani hanno permesso di capire che il batterio si attacca a recettori di membrana come il P-selectin ligando-1 (PSGL-1), molto rappresentato sulla superficie dei neutrofili, e il tetrasaccaride sialyl lewis-X (Hardalo e coll., 1995; Goodman e coll., 1999; Herron e coll., 2000; Kim e coll., 2002; Rikihisa, 2006a). Dopo il legame con il recettore, il batterio entra per endocitosi mediata da caveole e viene incorporato all'interno di fagosomi. Le caveole sono delle cosiddette zattere lipidiche, ricche in lipidi e proteine, che permettono al batterio di bypassare la via fagolisosomiale (Rikihisa, 2006a). A questo punto il batterio mette in atto diversi meccanismi per bloccare l'attività battericida dei neutrofili: previene la fusione fagolisosomiale, blocca l'attività dell'NADPH e inibisce l'apoptosi (Banerjee e coll., 2000; Fox., 2000; Mott e Rikihisa, 2000; Wang e coll., 2002). Sembra che la proteina AnkA del batterio entri nel nucleo ed interagisca con regioni regolatrici, limitando l'espressione di geni di difesa, tra i quali il gp91<sup>phox</sup>, un componente dell'NADPH ossidasi (Garcia-Garcia e coll., 2009). All'interno dei fagosomi il batterio inizia a replicare e si forma la classica morula, individuabile al microscopio ottico (Popov e coll., 1998), caratterizzata da venti o più microrganismi. La rottura del fagosoma e della membrana della cellula infetta, determinano la liberazione di batteri che vanno ad infettare nuove cellule. I neutrofili infetti con *A. phagocytophilum* si ritrovano nel sangue periferico e nei tessuti del sistema fagocitico mononucleare (milza, fegato e midollo osseo) (Dumler e coll., 2001; Egenvall e coll., 1998; 2000). E' stato dimostrato che il batterio determina nei granulociti una riduzione della motilità e della fagocitosi (Garyu e coll., 2005), e diminuisce l'aderenza all'endotelio e la tras migrazione degli stessi, che normalmente avviene attraverso un arruolamento mediato dalla selectina, l'attivazione cellulare e legando molecole di integrina (Carrade e coll., 2009). Una ricerca ha però evidenziato che i neutrofili di cani infettati sperimentalmente con un isolato svedese mostravano fagocitosi normale con incremento del *burst* respiratorio (Lilliehöök e coll., 1999). La diminuzione di adesione all'endotelio sembra dovuta alla perdita dei recettori PSGL-1 e L-selectina nei neutrofili infetti, in un momento in cui la  $\beta$ -integrina, la superfamiglia di immunoglobuline di adesione e le molecole di adesione intercellulare sono stimulate (Choi e coll., 2003). Questi meccanismi possono favorire la sopravvivenza del batterio nel circolo sanguigno (Carrade e coll., 2009).

Normalmente i neutrofili restano circolanti per 10-12 ore prima di penetrare in un tessuto e andare verso l'apoptosi, condizione questa che li rende una localizzazione sfavorevole per molti patogeni. Al contrario *A. phagocytophilum* è in grado di ritardare l'apoptosi garantendosi la sopravvivenza e la replicazione nei leucociti (Rikihisa, 2006; Carlyon e Fikrig, 2006; Lee e coll., 2008; Borjesson e coll., 2005; Yoshiie e coll., 2000).

Sebbene il meccanismo di trasferimento da cellula a cellula non sia conosciuto, il batterio induce il rilascio di IL-8, nell'uomo, e un aumento dell'espressione di CXCR2, un recettore dell'IL-8 che può determinare il reclutamento di nuovi neutrofili sensibili all'infezione e facilitarne l'assunzione da parte delle zecche (Akkoyunlu e coll., 2001; Scorpio e coll., 2004). Il batterio, inoltre, nell'uomo può infettare cellule

midollari CD34+, cellule endoteliali e cellule della linea dei megacariociti (Klein e coll., 1997a; Munderloh e coll., 2004; Granick e coll., 2008). Queste cellule possono servire come serbatoio per il trasferimento dell'infezione ai neutrofili circolanti (Carrade e coll., 2009).

Recentemente un isolato del batterio è stato modificato in laboratorio, gli è stata trasferita la capacità di esprimere proteine fluorescenti che potrebbero consentirne la visualizzazione nelle cellule attraverso la microscopia a fluorescenza (Felsheim e coll., 2006). Questa metodica potrebbe facilitare la comprensione della distribuzione tissutale, del legame cellulare, dell'ingresso e della replicazione di *A. phagocytophilum* in vivo.

Frequentemente l'anaplasmosi è associata a lieve o moderata trombocitopenia, ma possono essere presenti anche neutropenia, linfopenia, e anemia; i meccanismi alla base di queste alterazioni non sono però conosciuti (Carrade e coll., 2009). Nel siero di uomini (Wong e Thomas, 1998) e cani (Kohn e coll., 2008) con l'anaplasmosi sono stati ritrovati anticorpi anti-piastrine; anche altri meccanismi immunitari possono determinare la riduzione delle piastrine, tuttavia la trombocitopenia si verifica nelle forme acute, prima della formazione degli anticorpi e in topi senza cellule T e B, suggerendo che tale condizione sia correlata anche ad altri meccanismi (Borjesson e coll., 2001).

L'alterazione dei neutrofili e la leucopenia predispongono l'ospite ad infezioni secondarie. Questa condizione è stata riscontrata in pecore e bovini affetti da TBF. L'anaplasmosi può predisporre gli agnelli alla piemìa, caratterizzata da zoppia e paralisi, causata da *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella* spp. e *Listeria monocytogenes* (Foggie, 1956; Gilmour e coll., 1982; Øverås e coll., 1993; Grønstøl e Øverås, 1980). Infezioni opportunistiche sono state documentate e ipotizzate come causa di mortalità anche in uomini e cani con anaplasmosi granulocitica (Bakken e Dumler, 2008; Carlyon e Fikrig, 2006; Lepidi e coll., 2000). L'alterazione dei granulociti nell'uomo può influenzare la comparsa di un'infezione da *B. burgdorferi* (Nyarko e coll., 2006).

La risposta immunitaria all'infezione da *A. phagocytophilum* non è stata completamente caratterizzata. La produzione di IFN- $\gamma$  sembra svolgere un ruolo importante nella fase iniziale di controllo dell'infezione (Akkoyunlu e Fikrig, 2000; Birkner e coll., 2008), tuttavia sembra contribuire al processo infiammatorio associato alla malattia (Martin e coll., 2001).

La produzione di IFN- $\gamma$  può essere innescata dalla produzione di IL-10 e IL-18 (Pedra e coll., 2007a,b). I linfociti T-natural killer sono la prima fonte di INF- $\gamma$ , mentre le cellule dendritiche producono IL-12 e IL-18. In un modello murino di infezione, l'eliminazione dei batteri sembrava dipendere dalle cellule T CD4+ e non dalle citichine INF- $\gamma$  e IL-12 (Birkner e coll., 2008). Sebbene l'immunità cellulo-mediata sia considerata la più importante nel contrastare infezioni da patogeni intracellulari, i risultati ottenuti sul topo suggeriscono un importante ruolo dell'immunità umorale nella risposta verso questa infezione (Winslow e Bitsaktsis, 2005; Sun e coll., 1997). Gli anticorpi si sviluppano a seguito della fase extracellulare dell'infezione e possono attaccare strutture intracellulari contenenti i batteri o stimolare l'attività fagocitaria (Winslow e Bitsaktsis, 2005). Sia le cellule B che le T sono necessarie a contrastare l'infezione, infatti topi deficitari di questi linfociti rimangono persistentemente infetti. Al contrario i topi con scarsi linfociti T possono superare l'infezione (Birkner e coll., 2008).

Negli *agnelli* *A. phagocytophilum* riesce ad evadere la risposta immunitaria attraverso una diversa espressione della proteina di superficie MSP2; questa condizione è stata riscontrata anche nei bovini infettati con *A. marginale* (Granquist e coll., 2008; Barbet e coll., 2000).

Il cavallo, che può infettarsi con il ceppo agente di malattia nell'uomo, è un buon modello animale per lo studio dell'HGA (Madigan e coll., 1995). In uno studio effettuato su 4 cavalli infettati sperimentalmente si è visto un aumento dell'espressione dell'mRNA di IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  nei leucociti circolanti, tre dei cavalli testati hanno mostrato una stimolazione dell'espressione dell'mRNA dell'IL-8. Uno dei cavalli ha mostrato una debole espressione dell'mRNA di IFN- $\gamma$  L-10 e IL12 p35. Nessuno dei cavalli ha presentato livelli elevati di IL-2, IL-4, IL-6 o IL-12 p40 (Kim e coll., 2002). Anche nei ruminanti la concentrazione di TNF- $\alpha$  aumenta in modo considerevole in corso di infezione da *A. phagocytophilum*, come anche la concentrazione di nitrati (Gokce e Woldehiwet, 2002).

Maggiori studi sono comunque necessari per meglio capire il ruolo delle varie citochine nella patogenesi dell'anaplasmosi in vivo (Rikihisa, 2011).

La risposta immunitaria dell'ospite a successive infezioni da *A. phagocytophilum* è variabile. Studi effettuati su pecore e bovini hanno mostrato che la reintroduzione di soggetti che avevano superato la malattia in pascoli contaminati ha provocato lo sviluppo di batteriemia e rialzo febbrile in alcuni, mentre altri non si sono ammalati (Jamieson, 1947; Hudson, 1950; Littlejohn, 1950; Foggie, 1951). Studi sperimentali hanno anche evidenziato che l'infezione primaria è seguita da un grado variabile di resistenza verso un'infezione omologa (Foggie, 1951; Tuomi, 1967a; Woldehiwet e Scott, 1982a). Alcuni animali resistevano a nuove infezioni solo pochi mesi, ma altri risultavano protetti nei confronti dello stesso ceppo per più di un anno (Foggie, 1951; Woldehiwet e Scott., 1993). La resistenza era influenzata dal ceppo, dall'età e dal tipo di ospite, il lasso di tempo tra l'infezione primaria e la reinfezione e la frequenza di esposizione al patogeno (Foggie, 1951; Tuomi, 1967b,c; Woldehiwet e Scott, 1982b,c). Nel caso ad esempio di pecore, portate a pascolare in zone infestate e rimosse da queste aree per periodi superiori a 6 mesi, durante i quali hanno sviluppato la TBF, alcune possono manifestare aborti al momento della reintroduzione nello stesso pascolo infestato (Jamieson, 1947; Overas, 1962). Per quanto riguarda invece l'esposizione a ceppi diversi, sembra che bovini che ovini, precedentemente esposti ad un ceppo di TBF, manifestino reazione con febbre e batteriemia anche a seguito di infezione con varianti diverse, ma che la durata dell'infezione sia inferiore (Tuomi, 1967c; Woldehiwet e Scott, 1982c), suggerendo che i vari ceppi condividono alcuni antigeni. Anche nel cavallo è segnalata una parziale protezione verso infezioni omologhe (Nyindo e coll., 1978).

Ci sono pochi studi sulla dinamica della produzione anticorpale, ma in un studio condotto sulle pecore sono state riscontrate IgM e IgG specifiche entro 2 settimane dall'infezione, con una predominanza delle IgM nelle prime 3 settimane e delle IgG successivamente (Woldehiwet e Scott, 1982c). Questi autori riportano il rinvenimento di anticorpi IgM anche in animali persistentemente infetti. Anche nell'uomo si segnala la presenza di anticorpi IgM e IgG nelle fasi iniziali dell'infezione, con la riduzione del titolo di IgM successivamente (Zeman e coll., 2002; Walder e coll., 2003). Molti studi sierologici condotti sull'uomo si basano sul rilevamento di IgG (Woldehiwet, 2010).

Per quanto riguarda l'immunità cellulare mediata, i pochi studi effettuati *in vitro* sulle

pecore dimostrano l'importanza delle cellule T CD4+ nella risposta immunitaria dei ruminanti nell'inibizione della migrazione leucocitaria (Woldehiwet e Scott, 1982e) e nella proliferazione di linfociti mediata da antigeni (Gokce e Woldehiwet, 1999). Anche studi effettuati sull'uomo e su topi infettati con varianti HGA, mostrano la predominanza di linfociti T-helper 1 nella risposta, come indicato anche dalla produzione di IFN- $\gamma$  (Akkoyunlu e Fikrig, 2000; Dumler e coll., 2000).

## 3.6 SINTOMATOLOGIA

### 3.6.1 CANE

Nel cane l'infezione da *A. phagocytophilum* spesso rimane silente, come indicato dall'ampio livello di prevalenza in assenza di segni clinici in aree endemiche (Beall e coll., 2008; Foley e coll., 2001). Ad oggi non sono ancora stati segnalati casi di decesso nei cani dovuti a questa malattia (Carrade e coll., 2009). Diversi studi in USA, Germania e Scandinavia hanno riportato i rilievi clinici segnalati nei cani evidenziando che la sintomatologia può presentarsi differente secondo l'area geografica, riflettendo le diversità dei ceppi circolanti, aspetto già riconosciuto nelle infezioni in ovini e bovini (Stuen e coll., 2003; Pusterla e coll., 1999b).

I segni clinici comuni nei cani che manifestano la malattia sono letargia e febbre che compaiono dopo un periodo di incubazione di 1-2 settimane. La temperatura rettale è compresa tra 39,2 e 41,4°C. Sono segnalate anche inappetenza o anoressia (Greig e coll., 1996a; Poitout e coll., 2005; Kohn e coll., 2008). Frequentemente sono riportati anche segni clinici a livello muscolo-scheletrico come riluttanza al movimento e zoppia. In alcuni casi la zoppia deriva da una poliartrite neutrofilica (Skotarczak e coll., 2004; Foley e coll., 2007).

Infrequente è la segnalazione di tosse secca e di iniezione della sclera (Poitout e coll., 2005; Plier e coll., 2009).

Sintomi poco comuni sono: polidipsia, pallore delle membrane, segni gastroenterici quali vomito o diarrea, emorragie manifestate come petecchie, melena o epistassi (Greig e coll., 1996a; Poitout e coll., 2005; Kohn e coll., 2008).

Può essere riscontrata anche splenomegalia e lieve linfadenopatia, conseguenti alla reazione linfatica e nel caso della milza a un'attivazione dell'ematopoiesi extramidollare (Egenvall e coll., 1998; Hodzic e coll., 1998a). Raramente è segnalata anche epatomegalia (Mazepa e coll., 2010).

Sono stati segnalati sintomi neurologici caratterizzati da colpo apoplettico e deficit propriocettivo; il colpo apoplettico è stato però segnalato in un cane con una storia di epilessia (Greig e coll., 1996a).

La malattia nel cane sembra essere autolimitante, non sono infatti descritti casi cronici.

I rilievi di laboratorio in corso di anaplasmosi nel cane mostrano principalmente trombocitopenia, segnalata nel 90% dei casi (Greig e coll., 1996a; Poitout e coll., 2005; Kohn e coll., 2008). Il midollo osseo dei cani infetti presenta un aumento dei megacariociti, suggerendo che la carenza di piastrine sia dovuta alla distruzione delle stesse (Lilliehook e coll., 1998). Si segnalano anche linfopenia, deviazione a

sinistra e anemia (Mazepa e coll., 2010). Sono state segnalate inoltre sia neutrofilia che neutropenia nei dati relativi agli Stati Uniti (Greig e coll., 1996a; Poitout e coll., 2005), mentre in Germania molti cani oggetto di uno studio hanno presentato monocitosi (Kohn e coll., 2008).

L'esame sierologico può evidenziare lieve ipoalbuminemia, iperglobulinemia e lieve aumento dell'attività enzimatica epatica, soprattutto la fosfatasi alcalina.

Un caso clinico atipico è stato segnalato da Kane e coll. (2011) in un cucciolo di 20 settimane. Il soggetto presentava letargia e inappetenza, nausea e vomito; presentava segni di disidratazione e pallore delle mucose. All'esame emocromocitometrico si rilevava pancitopenia, confermata anche dallo striscio di sangue. Nei neutrofili non si riscontravano però gli inclusi tipici della malattia. Un aumento del liquido addominale ha suggerito l'impiego dell'ecografia e il liquido è stato prelevato e analizzato, permettendo di individuare i granulociti infetti da *A. phagocytophilum*. L'effusione peritoneale non era mai stata segnalata nel cane; ci sono segnalazioni nel cavallo, in cui questo sintomo sembra dovuto a fenomeni di vasculite. Anche in questo cucciolo si può ipotizzare un processo infiammatorio a carico dei vasi, indotto dal deposito di immunocomplessi e/o dalla produzione di citochine pro-infiammatorie da parte dei granulociti infetti (Kane e coll. 2011).

### 3.6.2 GATTO

I casi di anaplasmosi segnalati nel gatto non sono molti. La sintomatologia nei gatti è simile a quella dei cani: letargia, febbre e inappetenza (Bjöersdorff e coll., 1999b; Lappin e coll., 2004; Ravnik e coll., 2009; Kohn e coll., 2008). Un lavoro finlandese (Heikkilä e coll., 2010) riporta il caso clinico di un gatto di 3,5 anni di razza Maine coon. Il soggetto si presentava con febbre (39,5°C), tachipnea, rumori polmonari aumentati, dolore nella parte craniale dell'addome e scolo oculare bilaterale. Il gatto presentava inoltre 4 lesioni cutanee da morso di zecca ed una zecca è stata ritrovata attaccata sull'animale. I polmoni all'esame radiografico presentavano un lieve pattern bronchiolare. Il rinvenimento delle *morulae* nei neutrofili ha permesso la diagnosi, confermata anche dalla biologia molecolare. In questo soggetto sono stati rilevati segni clinici non specifici della malattia. Altri sintomi segnalati nel gatto sono: iperestesia, dolore muscolare e articolare, zoppia, rigidità del collo, linfadenomegalia, gengiviti, periodontiti, congiuntiviti, perdita di peso, vomito, faringiti, polidipsia, ematuria e problemi neurologici come tremori, incoordinazione (Granquist e coll., 2010a). L'anaplasmosi induce immunodepressione e in molti casi i sintomi riportati derivano da infezioni secondarie.

Il rilievo ematico più frequente è la trombocitopenia per distruzione delle piastrine inappetenza (Bjöersdorff e coll., 1999; Lappin e coll., 2004; Ravnik e coll., 2009; Lilliehook e coll., 1998; Carrade e coll., 2009). Questa condizione si presenta da lieve a moderata nei gatti (Bjöersdorff e coll., 1999; Lappin e coll., 2004) e da moderata a grave nei cani (Carrade e coll., 2009). Il gatto segnalato non presentava trombocitopenia ma leucopenia, già descritte in precedenti casi di anaplasmosi (Heikkilä e coll., 2010).



### 3.6.3 CAVALLO

Il periodo di incubazione nel cavallo è inferiore ai 14 giorni. La gravità dei sintomi varia in funzione dell'età dell'animale e della durata della malattia (Madigan e Gribble, 1987).

Soggetti di età superiore ai 4 anni generalmente manifestano segni progressivi di febbre, depressione, parziale anoressia, edema degli arti, petecchie, ittero, atassia e riluttanza al movimento. Clinicamente e sperimentalmente sembra che cavalli di età inferiore manifestino segni più lievi comprendenti febbre moderata, depressione, moderato edema agli arti e atassia. Nei puledri di età inferiore a un anno i segni clinici sono difficilmente individuabili, generalmente è presente solo la febbre.

Nei primi due giorni di infezione la febbre è solitamente alta (39,4-41,3°C). I primi sintomi sono riluttanza al movimento, atassia, depressione, ittero e petecchie. La debolezza e l'atassia possono essere gravi al punto di predisporre il soggetto a fratture in seguito a cadute. I cavalli manifestano anche appoggi a base larga, indicando un deficit della propriocezione. L'edema distale e segni clinici più gravi si presentano dal 3°-5° giorno, con febbre che persiste anche 14 giorni se non trattata. Raramente è presente un coinvolgimento cardiaco con sviluppo di aritmie. Il decorso clinico della malattia varia da 3 a 16 giorni; l'infezione può essere autolimitante anche in soggetti non trattati; i casi di morte sono in genere correlati ad infezioni secondarie.

I rilievi di laboratorio mostrano leucopenia, trombocitopenia, anemia, ittero e i caratteristici corpi inclusi nei granulociti (Pusterla e Madigan, 2007).

### 3.6.4 RUMINANTI

Negli ovini il periodo di incubazione dura 7 giorni. La malattia è caratterizzata da febbre alta, batteriemia, neutropenia, diminuita produzione di latte, aborto nelle femmine non immuni e diminuzione della fertilità nei montoni. Le infezioni sono in genere subcliniche specialmente nelle aree endemiche (Giudice e coll., 2011). Il recupero è di solito lento e gli animali possono rimanere portatori per lunghi periodi (Garippa e coll., 2010). Negli agnelli sono segnalate zoppie e perdite produttive (Stuen e coll., 2002).

Le pecore possono rimanere portatrici dell'infezione per mesi o addirittura anni (Woldehiwet, 2010). In uno studio è stato dimostrato che il sangue di una pecora era infettante per un'altra pecora *patogen-free* 25 mesi dopo l'infezione primaria (Foggie, 1951). Nello stesso studio, campioni di sangue prelevati in maniera casuale in vari momenti dell'anno da pecore di un'azienda infestata da zecche, erano infettanti per altre pecore sensibili. Questo dato suggerisce uno stato di persistenza dell'infezione in pecore serbatoio anche durante il periodo di mancata attività da parte delle zecche. Le pecore persistentemente infette non sviluppano segni clinici gravi, ma la batteriemia può essere attivata da interventi di splenectomia o da trattamenti immunosoppressivi (Foggie, 1951; Woldehiwet e Scott, 1993). Sembra comunque che, in condizioni di campo, il rinvenimento del patogeno nel sangue sia influenzato dalla quantità e dalla frequenza di infestazione da parte delle zecche. Questa condizione è dovuta ad una variazione della batteriemia in seguito

all'aumento di zecche attaccate o dovuto a frequenti re-infezioni (Ogden e coll., 2002a).

Non è ancora stato investigato se nei ruminati selvatici si riscontri questo stato di infezione persistente da TBF (Woldehiwet, 2010).

### 3.7 LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE

Siccome questa malattia nel cane è autolimitante, le informazioni riguardanti le lesioni anatomo-patologiche sono scarse. Il danno tissutale sembra risultare dalla risposta infiammatoria dell'ospite piuttosto che dall'azione stessa del batterio (Dumler e coll., 2007).

Anche per quanto riguarda l'uomo, le informazioni sono limitate. In uno studio effettuato da Lepidi e coll., (2000), sono stati valutati i quadri autoptici di 4 persone oltre a rilievi biotici di midollo osseo e linfonodi di altri pazienti sopravvissuti. Nella milza dei 4 pazienti morti era rilevabile una deplezione linfoide con un livello di infiltrazione macrofagica variabile, eritro-leucofagocitosi e aumento delle cellule apoptotiche. In un paziente è stato riscontrato anche un aumento di plasmacellule. Anche nei linfonodi di 3 di questi pazienti era presente deplezione linfoide ed eritro-fagocitosi; in un paziente invece erano presenti infiltrati macrofagici. In uno dei pazienti morti, un caso pediatrico, è stata riscontrata inizialmente una linfadenite con infiltrazione neutrofilia e macrofagica e in seguito una marcata iperplasia corticale.

A livello di midollo osseo è stata riscontrata reazione immunologica con presenza di aggregati linfoidi paratrabeolari e non-paratrabeolari.

In tutti i casi di decesso l'aspetto del fegato era simile: lieve infiltrazione periportale di linfo-istiociti, da lieve a moderata epatite lobulare linfo-istiocitica con occasionali aggregati di linfociti, macrofagi e neutrofili. In due casi si è osservata iperplasia delle cellule di Kuppfer, mentre in 3 casi apoptosi degli epatociti (Lepidi e coll., 2000).

I polmoni di un paziente mostravano segni di infiammazione, caratterizzati da lieve infiltrazione linfatica associata ad edema ed emorragie intra-alveolari.

In due pazienti, la causa della morte era correlata alla presenza di infezioni secondarie che avevano provocato esofagiti ulcerative sostenute in un caso da *Candida* spp. e nell'altro dal virus *Herpes simplex*, associato ad una concomitante infezione da *Cryptococcus* spp. (Lepidi e coll., 2000).

Gli stessi autori riportano anche i rilievi anatomopatologici di 6 cavalli e di un agnello di 9 mesi infettati sperimentalmente.

L'analisi dei tessuti ottenuti dai cavalli, soppressi nella fase acuta della malattia, rivelava che l'infezione si era instaurata in maniera diffusa in ogni animale, in molti organi erano presenti lesioni infiammatorie. Le milze mostravano deplezione linfoide e congestione nella polpa rossa con la presenza di molti macrofagi. Nei linfonodi era presente iperplasia paracorticale. Il midollo osseo era da normo a ipercellulare con normale maturazione della linea emopoietica. Le lesioni polmonari variavano da una lieve infiltrazione linfatica perivascolare a situazioni di edema delle pareti alveolari con infiltrazione di linfociti e macrofagi. Un cavallo ha presentato un quadro più grave caratterizzato da necrosi alveolare focale, fibrina intra-alveolare, essudato di cellule infiammatorie e polmonite interstiziale. A livello epatico i rilievi variavano da lievi infiltrazioni periportalì di cellule mononucleate ad epatite lobulare con aggregati

di macrofagi e neutrofili all'interno dei sinusoidi e focolai di apoptosi associati a piccole lesioni infiammatorie. In due cavalli, in cui furono esaminati muscoli e tendini degli arti, è stata segnalata una vasculite con intensa infiltrazione infiammatoria perivascolare; questa condizione però non è stata riscontrata in altri tessuti. Il rene di un cavallo presentava infiltrazioni interstiziali di cellule mononucleate e rari neutrofili.

Alla necropsia di un altro cavallo morto a seguito di infezione sperimentale con un ceppo svedese sono state segnalate petecchie diffuse, ecchimosi ed emorragie intratoraciche. All'esame microscopico si rilevarono vasculiti necrotizzanti e trombosi ialine, con infiltrazione periva scolare di cellule mononucleate. Nel fegato sono stati evidenziati aggregati di cellule infiammatorie nei sinusoidi e apoptosi degli epatociti. Le modificazioni vascolari, in questo caso clinico, erano correlate ad uno stato di CID, situazione che è stata segnalata anche nell'uomo (Bakken e Dumler, 2008).

L'agnello infettato sperimentalmente da Lepidi e coll., (2000) ha manifestato al quinto giorno una temperatura corporea di 41,6°C. L'esame microscopico dello striscio di sangue mostrava che il 56% dei neutrofili conteneva inclusi. L'esame della milza evidenziava una lieve diminuzione delle cellule linfoidi con incremento di macrofagi e neutrofili nei sinusoidi splenici. Nei linfonodi era presente iperplasia paracorticale. Il fegato era caratterizzato da lieve infiltrazione linfocitica periportale e piccoli aggregati macrofagici con adiacente apoptosi degli epatociti. Il polmone presentava solamente una lieve infiltrazione perivascolare di tipo mononucleare.

L'analisi immunologica degli strisci ha permesso di identificare che il 95% delle cellule infette nei tessuti erano neutrofili maturi. La caratteristica morula era individuabile all'interno delle cellule. Circa il 90% dei neutrofili infetti era presente nel lume dei vasi, principalmente nei sinusoidi della polpa rossa di un uomo, dei cavalli e della pecora (Lepidi e coll., 2000).

Raramente i granulociti infetti sono stati riscontrati nei sinusoidi epatici, nel midollo osseo o nei reni.

Gran parte degli aggregati presenti negli organi scarseggiavano in neutrofili. Le morule non sono state riscontrate negli infiltrate perivascolari o nei focolai di vasculite a livello di tendini e muscoli dei cavalli esaminati (Levine e coll., 2000).

Si è ipotizzato che il danno tissutale derivi dalla liberazione di sostanze da parte dei neutrofili infetti o attraverso l'induzione di attività procoagulante da parte dei monociti (Behl e coll., 2000). L'attivazione dei macrofagi nell'uomo è evidenziata dall'aumento di ferritina, IL-10, IL-12 p70 e IFN- $\gamma$  nel siero, come anche l'evidenza di emofagociti (Dumler e coll., 2007).

### 3.8 ASPETTI ZOONOSICI

La prima segnalazione di anaplasmosi nell'uomo risale al 1994 sebbene inizialmente tale infezione fosse stata identificata come erlichiosi granulocitica (HGE) (Chen e coll., 1994). Prima di allora si pensava che la malattia fosse limitata agli animali domestici e ai serbatoi selvatici (Ogden e coll., 1998a,b). La scoperta che l'agente causale di questa infezione fosse correlato a TBF e erlichiosi granulocitica equina (ora EGA), ha stimolato l'interesse scientifico verso questo agente eziologico, portando nuove informazioni biologiche e patogenetiche (Woldehiwet, 2010).

Infezioni nell'uomo da *A. phagocytophilum* sono state segnalate inizialmente nella parte nord orientale e alto medio occidente degli Stati Uniti (Dumler, 1997). Successivamente è stata ritrovata anche in altre parte degli USA (Foley e coll., 1999) e in Europa (Lotric-Furlan e coll., 1998).

La scoperta di Dumler e coll. (2001) ha permesso di identificare *A. phagocytophilum* come unico agente e di individuare le diverse varianti responsabili della malattia negli animali.

Il ceppo umano che provoca HGA negli USA e in parte dell'Europa è differente da quello che causa l'infezione nei ruminanti. Tentativi di infezione sperimentale nel bovino utilizzando la variante umana non hanno avuto successo (Pusterla e coll., 2001).

In Europa le prime segnalazioni sierologiche di infezione risalgono al 1995 in Svizzera e Regno Unito (Bronqui e coll., 1995; Sumption e coll., 1995), dopo queste prime segnalazione ne sono seguite altre da altre parti dell'Europa: in Germania (Fingerle e coll., 1997); in Danimarca (Lebech e coll., 1998); in Svizzera (Pusterla e coll., 1998b); in Svezia (Bjoersdorff e coll., 1999).

Negli USA l'epidemiologia dell'anaplasmosi umana è simile a quella della malattia di Lyme: i fattori di rischio comuni sono le punture di zecca ma anche il contatto con carcasse di animali infetti, come nel caso dei cacciatori o dei macellai di ruminanti selvatici (Bakken e coll., 1996a; 1999; Comer e coll., 1999). La trasmissione per via trasfusionale è possibile, come anche è stata dimostrata l'infezione transplacentare (McQuiston e coll., 2000; Kalantarpour e coll., 2000).

Il CDC di Atlanta ha registrato più di 2.900 casi di anaplasmosi umana negli USA dal 1994 al 2005, con un'incidenza annuale stimata attorno a 1,6 casi per milione negli USA. Tra i vari stati l'incidenza maggiore si registra nel Wisconsin (24-58 casi/100.000 abitanti), seguito da Connecticut (14-16 casi ogni 100 mila abitanti) e stato di New York (2,7/100.000) (Ismail e coll., 2011).

Negli ultimi anni diversi casi di HGA sono stati segnalati in Europa. Il primo caso è stato diagnosticato in Slovenia (Petrovec e coll., 1997). Dopo questo altre segnalazioni provengono dallo stesso paese (Lotric-Furlan e coll., 1998) e da altri stati europei: Croazia (Misic-Majerus e coll., 2000); Spagna (Oteo e coll., 2000); Scandinavia (Karlsson e coll., 2001); Norvegia (Kristensen e coll., 2001); Polonia (Tylewska-Wierzbanska e coll., 2001); Paesi Bassi (van Dobbenburgh e coll., 1999).

La sorveglianza siero-epidemiologica effettuata in Europa ha mostrato valori di prevalenza compresi tra 1,5 e 21% nei soggetti esposti a punture di zecca. Nello specifico, secondo quanto raccolto nello studio di Blanco e Oteo (2002), relativamente ai dati Europei, in Bulgaria si è riscontrata una prevalenza del 9,7% (Christova e Dumler, 1999); in Danimarca valori compresi tra 3,8 e 21% (Lebech e coll., 1998; Skarphedinsson e coll., 2001); in Francia il range va da 1,6 a 17% (Brouqui, 1999); in Germania si riportano valori tra 11,4 e 14% (Fingerle e coll., 1997); in Ungheria 12,5% (Bronqui, 1999); in Norvegia il 10,2% (Bakken e coll., 1996); in Slovenia 15,4% (Petrovec e coll., 1999; Cizman e coll., 2000); in Spagna 1,9-2,3% (Oteo e coll., 2001); in Svizzera valori dal 7,4 al 17,1% (Pusterla e coll., 1999; Bronqui e coll., 1995); in Svezia 8,1-11,5% (Dumler e coll., 1997; Bjoersdorff e coll., 1999a).

Recenti studi di sorveglianza epidemiologica o segnalazioni di casi di anaplasmosi in Europa riportano un dato di prevalenza del 31% in Belgio (Cochez e coll., 2011) e

una prevalenza del 7% in Slovacchia (Kalinova e coll., 2009); una prima segnalazione della malattia in Austria (Vogl e coll., 2009) e in Grecia (Chochlakis e coll., 2009b) e a Cipro (Psaroulaki e coll., 2009).

Le caratteristiche anagrafiche dei pazienti affetti da HGA negli USA sono: età media 51 anni, più del 95% dei soggetti positivi è di razza caucasica con una leggera predominanza dei maschi rispetto alle femmine (Demma e coll., 2006). I casi si verificano durante tutto l'anno con un picco in giugno e luglio, riflettendo probabilmente l'importanza delle ninfe nella trasmissione della malattia (Ismail e coll., 2011).

In Europa l'età media dei soggetti colpiti è di 38 anni; anche nel nostro continente c'è una leggera predominanza dei maschi sulle femmine. Il picco di infezione in Europa va da giugno ad agosto, periodo di massima attività dei vettori (Blanco e Oteo, 2002).

Dopo l'infezione pochi soggetti manifestano la forma clinica e sembra che i casi europei siano meno gravi di quelli statunitensi. La malattia si manifesta con sintomi simil influenzali: febbre, mialgia, artralgia e mal di testa. Si possono riscontrare anche segni di congiuntivite e linfadenopatia (Lotric-Furlan e coll., 1998; Arnez e coll., 2001; Bakken e Dumler, 2000; Karlsson e coll., 2001; Laferl e coll., 1999). Possono presentarsi tosse o polmonite e presenza di infiltrati a livello polmonare (Karlsson e coll., 2001). Sono stati segnalati anche sintomi gastrointestinali come diarrea, vomito e dolore addominale (Lotric-Furlan e coll., 1998; Arnez e coll., 2001; Petrovec e coll., 1997; van Dobbenburgh e coll., 1999; Oteo e coll., 2000). Occasionalmente sono segnalate anche epatomegalia e splenomegalia (Tylewska-Wierzbanska e coll., 2001; Laferl e coll., 1999). In rari casi è segnalato anche rash cutaneo (Bakken e Dumler, 2000; Bakken e coll., 1996b; Aguero-Rosenfeld e coll., 1996); in Europa questa sintomatologia è stata segnalata in due soli casi (Karlsson e coll., 2001). Sintomi a carico del sistema nervoso centrale sono stati segnalati solo nell'1% dei casi americani (Horowitz e coll., 1996; Dumler e coll., 2007); sono descritti anche sintomi nervosi periferici in alcuni pazienti: dolore al plesso brachiale, paralisi dei nervi craniali e facciali, polineuropatia demielinizzante (Dumler e coll., 2001; 2007; Horowitz e coll., 1996). Il recupero delle funzioni nervose può durare anche diversi mesi (Ismail e coll., 2011). La sintomatologia nervosa può essere dovuta a complicazioni o a infezioni concomitanti, come ad esempio la malattia di Lyme. L'esame del liquido cerebro-spinale viene effettuato raramente, ma le alterazioni segnalate comprendono pleiocitosi linfocitica e aumento della concentrazione proteica (Walker e Raoult, 2005; Horowitz e coll., 1996; Dumler e coll., 2007). In Europa non sono segnalati casi di meningite o di liquor patologico (Blanco e Oteo, 2002).

I casi europei hanno in genere esito favorevole (Blanco e Oteo, 2002). Negli USA la mortalità stimata è di 0-5% (Bakken e coll., 1994; Comer e coll., 1999; Bakken e coll., 1996b; Aguero-Rosenfeld e coll., 1996; Wallace e coll., 1998). Molti casi di morte sono associati ad infezioni secondarie dovute allo stato di immunodepressione, a seguito della neutropenia, o a malattie latenti (Bakken e coll., 1994; Aguero-Rosenfeld e coll., 1996; Jahangir e coll., 1998). I casi ospedalizzati in America sono compresi tra 8,7 e 56% (Bakken e coll., 1996b; 1999; Aguero-Rosenfeld e coll., 1996; Horowitz e coll., 1998b), nei casi europei riportati in letteratura quasi tutti i pazienti (80%) risultavano ospedalizzati (Blanco e Oteo, 2002). Le complicazioni segnalate sono: sindrome settica con CID (Bakken e coll.,

1994), sindrome respiratoria (Bjoersdorff e coll., 1999a; Wong e Grady, 1996), neuropatie periferiche (Bakken e coll., 1998a; Horowitz e coll., 1996), vertigini (Lotric-Furlan e coll., 1998; Tylewska-Wierzbanowska e coll., 2001), pancarditi (Jahangir e coll., 1998), essudazione e tamponamento pericardico (Goodman e coll., 1996), rabdomiolisi (van Dobbenburgh e coll., 1999) e gravi infezioni nosocomiali (Bakken e coll., 1994; Aguero-Rosenfeld e coll., 1996; Jahangir e coll., 1998). Non sono segnalati casi di infezione cronica e un caso di reinfezione è stato descritto in USA (Horowitz e coll., 1998b).

### 3.9 DIAGNOSI

L'anaplasmosi è una malattia con andamento stagionale, in relazione principalmente all'attività dei vettori. La diagnosi viene effettuata principalmente in base ad anamnesi, segni clinici e rilievi di laboratorio di tipo ematologico e chimico. I test sierologici possono aiutare nella conferma diagnostica, la diagnosi definitiva può essere emessa in seguito ad indagine molecolare (Greig e Armstrong, 2005).

#### 3.9.1 EMATOLOGIA

La microscopia ottica degli strisci di sangue intero o di buffy coat colorati con la tecnica Giemsa permette di individuare le morule all'interno dei granulociti.

Solitamente nell'uomo si osservano 800-1.000 granulociti per vetrino (Aguero-Rosenfeld e coll., 1996; Bakken e coll., 1996; Aguero-Rosenfeld, 2002). In genere i pazienti presentano meno dell'1% dei granulociti infetti e solitamente hanno leucopenia; per questo motivo l'utilizzo del buffy coat permette una maggiore attendibilità della diagnosi. Sono stati segnalati livelli di infezione del 40% nei granulociti circolanti (Bakken e coll., 1994). La sensibilità dell'esame del buffy coat nella fase acuta della malattia è del 60% (Bakken e coll., 2001). Quando presenti, le morule appaiono basofile o anifiliche e si riscontrano nei neutrofili e negli eosinofili (Olano e Aguero-Rosenfeld, 2007). Sempre nell'uomo a livello sierologico può essere presente un aumento di creatinina, lattato-deidrogenasi, creatin-fosfochinasi, amilasi e anomalie elettrolitiche come ipocalcemia, ipomagnesiemia ipofosfatemia, aumento del tempo di protrombina, aumento di prodotti di degradazione della fibrina, acidosi metabolica, CID, danno renale ed epatico, disfunzioni miocardiche (Bakken e Dumler, 2004; Dumler, 2005; Dumler e coll., 2007).

Nel cane, escludendo le morule, riscontrate in concentrazioni variabili nei neutrofili (7-32%) (Greig e coll., 1996b; Egenvall e coll., 1997; Poitout e coll., 2005), i rilievi di laboratorio più importanti sono trombocitopenia, presente nell'80% dei casi, linfopenia (90%), eosinopenia, moderata anemia non rigenerativa normocromica e normocitica (Egenvall e coll., 1997; Pusterla e coll., 1997; Gray, 1999). Alcuni cani possono presentare ipoalbuminemia, aumento dell'ALP, proteinuria e aumento dell'attività amilasica (Egenvall e coll., 1997; Gray, 1999).

Nei ruminanti la diagnosi si fa solitamente con l'esame microscopico, benché non sia molto sensibile. In caso di esito negativo si ricorre ad ulteriori indagini

sierologiche o molecolari (Garippa e coll., 2010).

Nel cavallo se si sospetta l'anaplasmosi la diagnosi viene effettuata ricercando le morule. Si osservano gli strisci di sangue intero o di buffy coat. Il numero delle cellule infette varia da 1% all'inizio dell'infezione, a 20-50% tra il giorno 3 e il giorno 5 di infezione. Per considerare un soggetto positivo è necessario vedere più di 3 inclusioni cellulari (Pusterla e Madigan, 2007).

### 3.9.2 SIEROLOGIA

L'analisi sierologica viene generalmente eseguita attraverso la metodica IFAT. *A. phagocytophilum* è una specie che comprende diverse varianti. Inizialmente gli antigeni utilizzati per allestire i vetrini provenivano da infezioni sperimentali negli animali eseguite con le varianti del cavallo e dei ruminanti (Bakken e coll., 1994; Dumler e coll., 1995; Madigan e coll., 1995). Per la diagnosi nell'uomo, ora si preferisce usare ceppi di anaplasma isolati dall'uomo e coltivati su linee cellulari HL-60 (Aguero-Rosenfeld e coll., 2000; Comer e coll., 1999; IJdo e coll., 1997; Ravyn e coll., 1998).

I sieri dovrebbero essere testati ad una sola diluizione (1:64 o 1:80) e la presenza di anticorpi determinata dopo incubazione con coniugato di fluoresceina istiocianato anti IgG/IgM umane. Se il primo screening risulta positivo, si procede poi con diluizioni per eseguire la titolazione. Una conferma sierologica di infezione si raggiunge quando si dimostra un aumento del titolo nel periodo di convalescenza o quando un soggetto con titolo  $\geq 80$  manifesta sintomatologia clinica tipica di HGA (Aguero-Rosenfeld e coll., 1996; Bakken e coll., 1996). Nelle aree endemiche circa 11-14% della popolazione presenta anticorpi, quindi il solo rilevamento di positività potrebbe non essere un dato importante (Aguero-Rosenfeld e coll., 2002; Bakken e coll., 1998b). Il rilievo tipico in corso di infezione acuta è un rapido aumento del titolo anticorpale nell'arco di 2 settimane, che raggiunge livelli  $\geq 640$  entro il primo mese (Aguero-Rosenfeld e coll., 2000). Molti pazienti presentano un titolo anticorpale individuabile per mesi o anni (Bakken e coll., 2001).

Sensibilità e specificità dell'immunofluorescenza sono alte, dato che esiste una buona correlazione tra sintomatologia clinica e reazione anticorpale (Aguero-Rosenfeld e coll., 1996; 2000; Bakken e coll., 1996). La ricerca di IgM è un buono strumento per la diagnosi di infezioni recenti, sembra invece che la sensibilità nella ricerca delle IgG non sia così alta (Walls e coll., 1999).

Altri test sierologici sono stati utilizzati nella diagnosi di HGA, come ad esempio ELISA e immunoblot, ma non vengono comunque impiegati nell'analisi di routine (Dumler e coll., 1995; Ravyn e coll., 1998). L'immunoblot può essere utilizzato per differenziare tra *A. phagocytophilum* ed *Ehrlichia chaffeensis*, in quanto i due antigeni hanno peso molecolare diverso, 44 kDa e 28-29 kDa rispettivamente (Dumler e coll., 1995; IJdo e coll., 1997; Wong e coll., 1997). All'esame IFAT si registra cross-reattività tra queste due specie, testando però i sieri con entrambi gli antigeni, spesso si rileva un titolo anticorpale maggiore per l'agente infettante omologo (Aguero-Rosenfeld e coll., 1996; Walls e coll., 1999).

Reazioni falsamente positive sono state segnalate in pazienti con altre infezioni da rickettsiaceae, febbre Q e virus Epstein-Barr. Molti pazienti positivi per HGA sviluppano anticorpi che reagiscono anche verso *B. burgdorferi* ai test ELISA e

immunoblot (Wormser e coll., 1997). In alcuni casi questo rinvenimento è stato associato a infezioni concomitanti da parte dei due agenti (Nadelman e coll., 1997; Wong e coll., 1997). Questo scenario si presenta comunque frequentemente in persone che vivono in aree molto endemiche (Magnarelli e coll., 1995; Bakken e coll., 1998b).

Anche nel cane la diagnosi sierologica viene effettuata con tecnica IFAT. Gli anticorpi IgG sono rilevabili 8 giorni dopo l'esposizione iniziale, 2-5 giorni dopo la comparsa delle morule. Durante le fasi acute della malattia però gli anticorpi potrebbero essere inapparenti. Siccome la positività sierologica può riflettere esposizioni precedenti, durante la convalescenza è opportuno valutare l'andamento del titolo anticorpale. Gli anticorpi nel sangue dei cani possono rimanere presenti per diversi mesi e fino anche a un anno dopo la guarigione (Egenvall., 1997; 2000; Poitout e coll., 2005).

Un ELISA polivalente che utilizza l'antigene p44 ricombinante è stato messo a punto per testare i sieri di cani e cavalli. La positività sierologica non implica che la causa della malattia del cane testato sia l'anaplasmosi, data la permanenza a lungo degli anticorpi, inoltre risultati negativi all'IFAT e all'ELISA possono verificarsi anche in cani con la forma acuta, a seguito del ritardo nella produzione di anticorpi in relazione alla comparsa dei segni clinici (Carrade e coll., 2011).

Cross-reattività sierologica può esistere tra le diverse specie di *Anaplasma*. Utilizzando anticorpi monoclonali che reagiscono con la proteina di superficie Msp5, una cross-reattività del 100% è stata riscontrata tra *A. phagocytophilum* e *A. marginale* utilizzando un ELISA indiretto, ma tale evenienza non si è riscontrata utilizzando invece un ELISA competitivo (Strik e coll., 2007). Anche cani positivi per *A. platys* reagiscono positivamente ai test per *A. phagocytophilum*, compresi quelli che utilizzano l'antigene Msp2 (Bowman e coll., 2009). Cross-reattività è segnalata anche tra *A. phagocytophilum* ed *E. canis*, ma non è molto frequente (Poitout e coll., 2005; Plier e coll., 2009; Breitschwerdt e coll., 1999).

L'immunofluorescenza indiretta può essere effettuata anche sul siero di cavallo; sono disponibili anche kit commerciali (Passamonti e coll., 2010).

A seguito di casi di aborto, l'infezione nei greggi o nelle mandrie di bovini può essere identificata dall'aumento del titolo anticorpale attraverso la fissazione del complemento (Woldehiwet e Scott., 1982d), l'immuno-elettroforesi "counter-current" (Webster e Mitchell, 1988), l'immunofluorescenza indiretta (Paxton e Scott, 1989; Woldehiwet e Horrocks, 2005) o l'ELISA (Woldehiwet e Horrocks, 2005). E' disponibile anche un kit commerciale ELISA competitivo, che ricerca gli anticorpi specifici nei confronti della proteina Msp5 (Knowles e coll., 1996).

### 3.9.3 BIOLOGIA MOLECOLARE

Molti protocolli di PCR sono stati messi a punto per il rilevamento del DNA di *A. phagocytophilum* (Edelman e Dumler, 1996; Massung e Slater, 2003; Sumner e coll., 1997). La regione più analizzata è il 16S rRNA, in quanto relativamente specifica come target per l'amplificazione. In genere si effettuano PCR tradizionali, ma possono anche essere eseguite nested-PCR che permettono di amplificare inizialmente il 16S rRNA degli eubatteri e successivamente, con primer specifici per *A. phagocytophilum*, una regione più interna (Standaert e coll., 1995; Massung e



Slater, 2003).

Nella fase acuta della malattia è utile anche l'analisi del gene GroESL utilizzando la nested-PCR. La lunghezza del prodotto di amplificazione varia tra le specie *A. phagocytophilum* e *E. chaffeensis*, rispettivamente 480 e 528bp (Sumner e coll., 1997). La sensibilità e specificità ottenute con diversi set di primer sono state valutate da Massung e Slater (2003) utilizzando diluizioni seriali di DNA estratto da linee HL-60 infettate con *A. phagocytophilum*. La specificità è stata confrontata utilizzando il DNA estratto da colture di *E. chaffeensis*, *Rickettsia rickettsii* e *Bartonella henselae*. I primer che hanno portato i migliori risultati sono quelli che amplificano il 16S rRNA e quelli per il gene Msp2.

Più recentemente sono stati messi a punto anche dei protocolli di multiplex PCR per evidenziare *Ehrlichia* e *Anaplasma* spp contemporaneamente utilizzando la real-time PCR (Courtney e Massung, 2003) e la real-time retro trascritta (Sirigireddy e Ganta, 2005). Quest'ultimo tipo di analisi ha una sensibilità tale da permettere il rinvenimento di 100 molecole di 16s rRNA, corrispondenti a una cellula infetta per campione. Un altro approccio utilizzando la real time PCR è di tipo quantitativo. Drazenovich e coll. (2006) hanno messo a punto un protocollo di TaqMan-PCR utilizzando come target il gene Msp2, molto sensibile e specifico per i diversi ceppi di *A. phagocytophilum*. Questo tipo di analisi si è dimostrata essere più sensibile rispetto alla nested-PCR eseguita sul 16S rRNA. La specificità è stata testata su differenti ceppi di *Anaplasma* isolati da varie specie animali e in diversi paesi e su altri batteri più o meno correlati ad *A. phagocytophilum* (Drazenovich e coll., 2006).

Negli ultimi anni l'interesse per la variabilità genetica di questo patogeno è aumentato notevolmente. Le diverse varianti mostrano differenze nei vettori, nel tropismo d'ospite, nella patogenicità e nella distribuzione geografica (Massung e coll., 2002a; Stuenkel e coll., 2002; Carpi e coll., 2009). Per questo motivo diversi geni sono studiati per caratterizzare queste varianti, come ad esempio i geni per la regione 23S-5S rRNA (Massung e coll., 2002a), 16S rRNA (Silaghi e coll., 2011a,b), quelli per le proteine msp2 (Morissette e coll., 2009) e msp4 (de la Fuente e coll., 2005); i geni groEL, ankA, gltA (Carpi e coll., 2009; Shukla e coll., 2007).

#### 3.9.4 COLTURE CELLULARI

*A. phagocytophilum* può essere coltivato *in vitro* con successo su diverse linee cellulari.

La coltivazione di ceppi umani ad ora è stata effettuata solamente negli USA. Non sono ancora stati descritti isolati umani in Europa o Asia (Olano e Aguero-Rosenfeld, 2007). Negli USA ceppi da uomo, cavalli e cani sono stati isolati su HL-60 e su ISE6 e IDE8 (Goodman e coll., 1996; Munderloh e coll., 1996; 1999; Horowitz e coll., 1998) e il ceppo Ap-V1 è stato isolato su cellule ISE6 e HL-60 sia da pecore infettate sperimentalmente che da zecche *I. scapularis* raccolte su cervi dalla coda bianca (Massung e coll., 2007).

In Europa sono stati coltivati dei ceppi isolati da cavalli su cellule HL-60 (Bjoersdorff e coll., 2002), da pecore su cellule ISE6 e IDE8 (Woldehiwet e coll., 2002; Woldehiwet e Horrocks, 2005) e da caprioli sempre su IDE8 (Silaghi e coll., 2011b).

Lo scopo di ottenere colture *in vitro* può essere quello di produrre antigeni omologhi da impiegare nell'allestimento di test sierologici con IFAT o ELISA (Woldehiwet e

Horrocks, 2005); studiare la variabilità genetica dei ceppi isolati (Bjoersdorff e coll., 2002) e studiare i meccanismi patogenetici alla base delle infezioni sostenute da *A. phagocytophilum*.

### 3.10 TERAPIA

Il batterio *A. phagocytophilum* è sensibile ad un gran numero di antibiotici: doxyciclina, rifampicina, fluorochinoloni (ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina e trovafloxacina). mentre è resistente a clindamicina, trimetoprim-sulfametazolo, imipenem-cilastatina, ampicillina, amoxicillina, eritromicina, claritromicina, ceftriaxone, e azitromicina (Klein e coll., 1997b; Horowitz e coll., 2001), sebbene un esito favorevole si sia ottenuto con l'azitromicina (Lotric-Furlan e coll., 1998). Cloramfenicolo e gentamicina hanno una scarsa attività inibitoria nei confronti di questo batterio (Klein e coll., 1997).

**Uomo:** la terapia d'elezione è costituita dalla doxyciclina alla dose di 100 mg BID per 7-10 giorni. Nel caso di sensibilità verso questa molecola sono consigliate rifampicina e chinoloni. La rifampicina può essere utilizzata nelle donne in gravidanza. I sintomi regrediscono generalmente nell'arco di 24-48 ore dall'inizio della terapia (Bakken e coll., 1996; Agüero-Rosenfeld e coll., 1996).

**Cane-gatto:** anche nel cane le tetracicline sono i farmaci d'elezione. Per i cuccioli di età inferiore ad un anno si può utilizzare il cloramfenicolo per prevenire l'ingiallimento dei denti. La posologia prevede 5-10 mg/kg PO una o due volte al giorno per 10 giorni di doxyciclina oppure 22 mg/kg ogni 8 ore per 14-21 giorni di tetraciclina (Greig e Armstrong, 2005). Molti cani presentano un miglioramento clinico in 24-48 ore, ma alcuni proprietari segnalano occasionalmente che sono necessari mesi o anni per avere la risoluzione completa dei sintomi (Greig e coll., 1996; Egenvall e coll., 2000). Importante è anche il controllo di infezioni concomitanti, per aumentare l'efficacia della terapia con tetracicline (Greig e Armstrong, 2006).

**Cavallo:** la terapia descritta nel cavallo prevede l'utilizzo di ossitettraciclina alla dose di 7 mg/kg una volta al giorno per 5-7 giorni. Un rapido miglioramento clinico, il ritorno dell'appetito e l'abbassamento della febbre vengono segnalati nel giro di 12 ore dal trattamento. L'atassia può permanere per 2-3 giorni e l'edema agli arti per più tempo. Nei casi più gravi sono consigliate terapie di supporto come fluido terapia, bendaggio degli arti e ricovero in box per prevenire traumi conseguenti alle difficoltà motorie (Pusterla e Madigan, 2007). Negli animali in cui atassia e edemi sono particolarmente gravi è consigliata la somministrazione di desametasone alla dose di 20 mg per 2-3 giorni (Otranto e Traversa, 2010).

**Ruminanti:** la terapia raramente è necessaria (Garippa, 2010) ma può avere una buona efficacia se utilizzata in maniera strategica (Brodie e coll., 1986; Watt e coll., 1968). Negli agnelli per ridurre morbidità e mortalità dovuta alla piemia da zecche si utilizzano formulazioni di tetracicline long-acting (Watt e coll., 1968).

### 3.11 PROFILASSI

Come per le altre malattie trasmesse da zecche, nell'uomo la profilassi diretta consigliata è quella di evitare zone a rischio di infezione e aree contaminate da zecche dalla primavera all'autunno, o nel caso di frequentazione di luoghi a rischio, utilizzare prodotti repellenti e indossare un abbigliamento atto a prevenire l'attacco da parte delle zecche (Parola e Raoult, 2001a,b; Oteo e coll., 2001a). Inoltre si può effettuare una terapia profilattica con doxyciclina e tetraciclina prima di andare in regioni endemiche (Greig e Armstrong, 2006).

Siccome il patogeno viene trasmesso nelle prime ore del pasto di sangue, la rimozione precoce della zecca non esclude l'infezione (des Vignes e coll., 2001).

Anche per gli animali la profilassi prevede di limitare le infestazioni da zecche utilizzando prodotti acarici e repellenti e rimuovendo tempestivamente le zecche (Carrade e coll., 2009).

Non sono ancora stati allestiti vaccini attivi contro *A. phagocytophilum*. Lo sviluppo di vaccini attivi contro batteri intracellulari richiede l'identificazione di componenti batteriche necessarie per determinare l'immunità protettiva (Woldehiwet, 2006).

# 4

## **BORRELIOSI DI LYME**

## 4.1 CENNI STORICI

La borreliosi di Lyme (LB), o malattia di Lyme, è una malattia dell'uomo e degli animali causata dalla spirocheta *Borrelia burgdorferi*, che è trasmessa da zecche del complesso *Ixodes*. Sebbene la diagnosi di LB sia abbastanza recente, si ritiene che le prime segnalazioni della malattia risalgano al 1883 e ai primi anni del 1900 quando furono riportati in Scandinavia casi di acrodermatite cronica atrofica (ACA), che rappresenta il terzo stadio della malattia (Buchwald, 1883; Herxheimer e Hartmann, 1902; Weber, 1993; Aguero-Rosenfeld e coll., 2005). Alcuni anni dopo Afzelius (1921) descrisse un eritema migrante, ora conosciuto come il primo stadio della malattia, come un rash cutaneo diffusivo in pazienti colpiti dal morso di una zecca delle pecore. Nel 1913 Lipschütz chiamò questa manifestazione cutanea eritema cronico migrante (ECM), un termine tuttora utilizzato. Nel 1930 Hellerstrom associò sintomi neurologici alla forma cutanea. Lennhoff nel 1948 e Thyresson nel 1949 sospettarono che la malattia potesse avere un'eziologia batterica e utilizzarono la penicillina nel trattamento di eritema e acrodermatite.

La prima reale descrizione del patogeno risale però alla fine degli anni 70, negli USA, in seguito ad un'epidemia umana di artriti reumatiche e rash cutanei verificatisi in tre contee contigue: Lyme, Old Lyme (da cui il nome della malattia) e Haddam Est in Connecticut (Steere e coll., 1977b; 1989; 2006). Le indagini eseguite in seguito a questa epidemia permisero di scoprirne l'eziologia batterica (Steere e coll., 1977a; Burgdorfer e coll., 1982; Bacon e coll., 2008). Nel 1982 Burgdorfer isolò l'agente eziologico dall'intestino della zecca *I. scapularis* e gli conferì il nome *Borrelia burgdorferi*. Successivamente il batterio è stato ritrovato in biopsie cutanee, liquido cerebrospinale o in campioni di sangue di pazienti ammalati sia negli Stati Uniti (Benach e coll., 1983; Steere e coll., 1983) che in Europa (Preac-Mursic e coll., 1984; Ackermann e coll., 1984; Asbrink e Hovmark, 1985). Negli USA il CDC di Atlanta (Center for Disease Control and Prevention) diede inizio ad un piano di sorveglianza per la malattia di Lyme nel 1982 e il Consiglio degli Epidemiologi di Stato e del Territorio dichiarò tale malattia denunciabile nel 1990 (Aguero-Rosenfeld e coll., 2005).

Studi successivi hanno suddiviso la specie *B. burgdorferi* in 3 sottospecie patogene per l'uomo quali *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* e *B. garinii* (Baranton e coll., 1992), oltre ad altre sottospecie poco o non patogene: *B. andersoni* (Marconi e coll., 1995), *B. bissettii* (Rudenko e coll., 2008), *B. japonica* (Kawabata e coll., 1993), *B. lusitanae* (Le Fleche e coll., 1997), *B. tanukii*, *B. turdi* (Fukunaga e coll., 1996), *B. sinica* (Masuzawa e coll., 2001), *B. spielmanii* (Richter e coll., 2006), *B. valaisiana* (Wang e coll., 1997), *B. californiensis* (Postic e coll., 2007), *B. carolinensis* (Rudenko e coll., 2009b) e *B. americana* (Rudenko e coll., 2009b), *B. yangtze* (Chu e coll. 2008), *B. bavariensis* (Margos e coll., 2009) e *B. kurtenbachii* (Margos e coll., 2010), oltre alla Genospecie 2 (Postic e coll., 2007).

In Nord America l'unica specie che causa malattia nell'uomo è *B. burgdorferi* s.s., mentre in Europa in corso di malattia sono state isolate tutte 3 le specie patogene. Tra gli isolati cutanei europei c'è una discreta prevalenza di *B. afzelii*, mentre nel liquor generalmente prevale *B. garinii* (Canica e coll., 1993; Wilske e coll., 1993; Eiffert e coll., 1995). Studi effettuati sul gene ospA dimostrano che le varianti che

causano la forma artritica sono eterogenei e non limitati a *B. burgdorferi* s.s. (Eiffert e coll., 1998; Vasiliu e coll., 1998).

La malattia di Lyme è la più diffusa malattia da artropodi degli USA e rappresenta un importante problema di Sanità Pubblica. La malattia di Lyme è ampiamente diffusa in Europa e segnalata anche nella Russia orientale e nei paesi asiatici (Hubalek e Halouzka, 1997; Saint Giron e coll., 1998; Wang e coll., 1999). In Europa è stata inizialmente segnalata in Germania, Svizzera, Austria, Paesi Bassi, Belgio, Irlanda, Svezia, Finlandia, Croazia, Slovenia, Francia, ma è stata descritta anche in Italia, Slovacchia, Russia europea, con dati di prevalenza inferiore (Hubalek e Halouzka, 1997). Questi autori tuttavia segnalano che potenzialmente la malattia potrebbe essere presente in tutto il continente, data la diffusione del suo vettore *Ixodes ricinus*.

Negli ultimi vent'anni sono stati fatti notevoli progressi nello studio della malattia di Lyme, sia per quanto riguarda la conoscenza degli aspetti microbiologici (Barbour e Hayes, 1986; Bergstrom e coll., 1991; Wang e coll., 2001; Rosa e coll., 2005), di ecologia ed epidemiologia (Anderson, 1991; Burgdorfer e coll., 1991; Parola e Raoult, 2001; Schwan, 1996; Schwan e Piesman, 2002), della patogenesi (Hu e Klempner, 1997; Nordstrand e coll., 2000; Steere e Glickstein, 2004; Szczepanski e Benach, 1991; Trevejo e coll., 1999), degli aspetti clinici (Nadelman e Wormser, 1998; Pfister e coll., 1994; Stanek e coll., 1996; Stanek e Strle, 2003; Steere, 1989; 2001; Wormser e coll., 2000) e della diagnosi di laboratorio (Barbour, 1988; Schmidt, 1997; Bunikis e Barbour, 2002; Wilske e Preac-Mursic, 1993; Wilske, 2003; Wilske e Schriefer, 2003). Si stima che, nei soli Stati Uniti, si testino ogni anno 2,7 milioni di sieri per la ricerca di anticorpi specifici contro *B. burgdorferi* (Tugwell e coll., 1997).

L'interesse per questa malattia è aumentato anche in seguito alla pubblicità che ne è stata fatta sia dalla stampa sia su internet, che ha creato quasi situazioni di isteria riguardo i rischi e le complicazioni possibili. La pubblicità, unita ad un elevato numero di diagnosi errate, ha provocato uno stato di ansietà nei confronti della malattia di Lyme non commisurato alla reale azione patogena (Shapiro e Gerber, 2000).

Oltre all'uomo, la malattia può colpire frequentemente il cane nel quale la malattia è stata segnalata per la prima volta negli anni '80 in USA (Lissman e coll., 1984; Kornblatt e coll., 1985; Magnarelli e coll., 1987) e solo più recentemente in Europa. Segnalazioni provengono da Germania (Bauerfeind e coll., 1998), Paesi Bassi (Jacobson e coll., 1996; Grauer e coll., 1998; Hovius e coll., 2000), Belgio (McKenna e coll., 1995), Francia (Doby e coll., 1988; avoust e Boni, 1998), Regno Unito (May e coll., 1991), Slovacchia (Stefancikova e coll., 1996) e Spagna (Delgado e Carmenses, 1995).

Anche altri animali quali gatto, cavallo e bovino possono presentare segni clinici (Magnarelli e coll., 1987; Steere, 1989; Parker e coll., 1992; Appel e coll., 1993; Magnarelli e coll., 1998; 2000b; 2001). Negli animali selvatici invece la sintomatologia si presenta raramente, suggerendo il raggiungimento di un equilibrio ospite-parassita (Skotarczak, 2002).

## 4.2 CLASSIFICAZIONE E DESCRIZIONE DELL'AGENTE EZIOLOGICO

Regno: Bacteria

Phylum: Spirochaetes

Classe: Spirochaetia

Ordine: Spirochaetes

Famiglia: Spirochaetaceae

Specie: *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Con il nome *Borrelia burgdorferi* s.l. sono definiti un gruppo di batteri Gram negativi, di forma spirillare con molti endoflagelli, di lunghezza 10-30 µm e larghezza 0,2-0,25 (Barbour e Hayes, 1986). Questo gruppo è formato da diverse genospecie tra le quali si distinguono quelle che determinano la malattia di Lyme negli animali e nell'uomo. Questi batteri si presentano mobili in coltura e nei vetrini a fresco, la visualizzazione di questa motilità è possibile attraverso il microscopio a campo oscuro o a contrasto di fase. L'osservazione di questi batteri può essere fatta anche al microscopio ottico tradizionale con colorazione Giemsa, dopo impregnazione argantica del vetrino o con metodi di fluorescenza.

L'ultrastruttura batterica è costituita da uno strato esterno viscido, da una membrana trilaminare esterna che circonda lo strato periplasmico, all'interno del quale sono contenuti 7-11 flagelli periplasmici (o endoflagelli) e il cilindro protoplasmico (Hayes e Burgdorfer, 1993). I flagelli si dipartono dalle estremità e si attorcigliano attorno al cilindro protoplasmico al centro della cellula. Il cilindro protoplasmico è costituito da uno strato di peptidoglicani e da una membrana interna che racchiude i componenti interni della cellula (Wang e Schwartz, 2011). I flagelli hanno sia funzione scheletrica che di movimento. L'inattivazione del gene che codifica per la proteina del filamento flagellare maggiore (FlaB) esita nella perdita della motilità e in una forma bastoncellare del batterio, anziché la classica spirallata (Motaleb e coll., 2000). La composizione lipidica della membrana esterna e della cellula sono molto simili, suggerendo che il maggior trasferimento di lipidi avviene tra il citoplasma e le membrane esterne. Le membrane esterne costituiscono circa il 16,5% del peso secco delle spirochete. Analisi chimiche rivelano una composizione per il 45,9% proteica, il 50,8% lipidica e il 3,8% costituita da carboidrati (Coleman e coll., 1986). La membrana periplasmica presenta un basso peso specifico (1,12 g/cm<sup>2</sup>) ma un'alta percentuale di proteine (56%). Dato che in *B. burgdorferi* manca la capacità di allungare gli acidi grassi a lunga catena, quando messi in coltura i batteri riflettono la composizione lipidica del medium.

Le specie di *Borrelia* sono abitualmente coltivate nel terreno liquido Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) II, in condizioni di microaerofilia ad una temperatura ottimale di 30-34°C. I batteri crescono lentamente, dividendosi ogni 8-12 ore durante la fase esponenziale. Ceppi adattati alla crescita in coltura possono raggiungere una densità di 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> cellule per ml dopo 5-7 giorni di coltura (Preac-Mursic, 1991). *B. burgdorferi* s.l. può essere coltivata anche su terreno BSK solidificato con 1,5% di agarosio (Kurtti e coll., 1987). Le colonie vengono in genere osservate dopo 2-3 settimane di incubazione e presentano differenze morfologiche tra i diversi ceppi, ad esempio colonie rotonde e compatte (diametro medio 0,43 µm) diffuse sulla

superficie agarizzata, colonie diffuse (diametro medio 1,80  $\mu\text{m}$ ) che penetrano nel medium, o colonie con un centro rilevato circondate da un ampio anello di spirochete (Wang e Schwartz, 2011). Questo batterio è carente di geni che codificano enzimi per la sintesi di molti amminoacidi, acidi grassi, cofattori enzimatici e nucleotidi che devono essere presi dall'esterno e che sono quindi indispensabili nel medium di coltura. Al contrario ci sono 52 ORF (Open Reading Frames) che codificano per proteine di legame e di trasporto che contribuiscono a 16 diversi sistemi di trasporto di membrana per amminoacidi, carboidrati, anioni e cationi (Fraser e coll., 1997). *B. burgdorferi* s. l. presenta inoltre limitate capacità metaboliche. La crescita dipende in gran parte dai nutrimenti forniti con il medium, nel caso delle colture, o dagli ospiti (mammiferi o zecche).

Analisi genomiche e la riproduzione del meccanismo metabolico suggeriscono che il batterio utilizza il glucosio come fonte primaria di carbonio ed energia, ma altri carboidrati come glicerolo, glucosamina, fruttosio e maltosio vengono impiegati nella glicolisi. *B. burgdorferi* non presenta geni codificanti per gli enzimi del ciclo dell'acido tricarbossilico o componenti del sistema di trasporto degli elettroni (Fraser e coll., 1997). L'acido lattico è il principale prodotto finale della glicolisi, in linea con la natura microaerofila del batterio (Wang e Schwartz, 2011).

Il genoma di *B. burgdorferi* è stato completamente sequenziato (Fraser e coll., 1997; Casjens e coll., 2000). L'analisi del genoma rivela che queste borrelie possiedono caratteristiche uniche tra i procarioti quali: presenza di un cromosoma lineare di circa 1000 kb e molti plasmidi circolari e lineari all'interno di ciascun batterio, in numero variabile in relazione alla specie e al ceppo. L'organizzazione dell'RNA ribosomiale è caratterizzata da un singolo 16S rRNA e ripetuti geni 23S e 5S rRNA, alta prevalenza di geni codificanti per lipoproteine, una notevole porzione di plasmidi che si presenta in uno stato di deterioramento e l'evidenza di numerosi riarrangiamenti del DNA tra i geni plasmidici (Fraser e coll., 1997; Casjens e coll., 2000).

Le membrane esterne contengono molte proteine di superficie (Osps-Outer surface proteins) tra le quali OspA, OspB e OspC. Sebbene il ruolo di queste proteine non sia ancora ben conosciuto, geni differenti per queste proteine sono espressi in momenti differenti durante la trasmissione dalla zecca al mammifero. I geni che codificano per queste proteine sono localizzati nei plasmidi (Shapiro e Gerber, 2000).

La variabilità antigenica di *B. burgdorferi* s. l. è stata ampiamente studiata. Le variazioni possono essere in seguito a ricombinazione plasmidica che permette di eludere la risposta immunitaria dell'ospite e favorisce la persistenza dell'infezione (Zhang e coll, 1997a).

Le genospecie afferenti a *B. burgdorferi* s. l. sono in totale 18. Nella tabella X sono indicate le diverse specie con relativi vettori, ospiti e localizzazioni geografiche. Tutte le genospecie sono trasmesse da zecche Ixodidae.



SPECIE	VETTORE	OSPITE/ SERBATOIO	DISTRIBUZIONE
<i>B. afzelii</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	Roditori	Europa, Asia
<i>B. americana</i>	<i>I. pacificus</i> , <i>I. minor</i>	Uccelli	USA
<i>B. andersoni</i>	<i>I. dentatus</i>	Coniglio	USA
<i>B. bavariensis</i>	<i>I. ricinus</i>	Roditori	Europa
<i>B. bisettii</i>	<i>I. scapularis</i> , <i>I. pacificus</i>	Roditori	USA
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	<i>Ixodes scapularis</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>I. pacificus</i>	Roditori, lucertole, uccelli, grandi mammiferi	USA, Europa
<i>B. californiensis</i>	<i>I. pacificus</i> , <i>I. jellisonii</i> , <i>I. spinipalpis</i>	Ratto canguro, cervo mulo	USA
<i>B. carolinensis</i>	<i>I. minor</i>	Roditori, uccelli	USA
<i>B. garinii</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>I. uriae</i> , <i>I. hexagonus</i> , <i>I. nipponensis</i>	Roditori, uccelli marini, lucertole	Europa, Asia, Poli
<i>B. japonica</i>	<i>I. ovatus</i>	Roditori	Giappone
<i>B. kurtenbachii</i>	<i>I. scapularis</i>	Roditori	USA, Europa
<i>B. lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i>	Lucertole, roditori	Europa, Nord Africa
<i>B. sinica</i>	<i>I. ovatus</i>	Roditori	Cina
<i>B. spielmanii</i>	<i>I. ricinus</i>	Roditori	Europa
<i>B. tanukii</i>	<i>I. tanukii</i> , <i>I. ovatus</i>	Roditori	Giappone
<i>B. turdi</i>	<i>I. turdus</i>	Uccelli passeriformi	Giappone
<i>B. valaisiana</i>	<i>I. ricinus</i>	Uccelli, roditori	Europa, Asia
<i>B. yangtze</i>	<i>Haemaphysalis longicornis</i> , <i>I. granulatus</i>	Roditori	Cina

Tabella 4.1: Caratteristiche delle genospecie di *B. burgdorferi* s.L.  
(Wilske e coll., 2007b; Rudenko e coll., 2011)

Le specie che ad ora non sono ancora state associate a malattia nell'uomo sono: *B. americana*, *B. andersonii*, *B. californiensis*, *B. carolinensis*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. sinica* e *B. yangtze* (Rudenko e coll. 2011). Le specie invece che principalmente si associano a malattia sono *B. burgdorferi* s.s. in USA e *B. afzelii* e *B. garinii* in Europa (Rudenko e coll. 2011), altre invece sono segnalate come potenzialmente patogene sia per l'uomo sia per gli animali: *B. bisettii*, *B. valaisiana* e *B. lusitaniae*. Altre segnalazioni riportano un ruolo patogeno nell'uomo per le specie *B. bavariensis*, *B. kurtenbachii* e *B. spielmanii* (Picken e coll., 1996; Rijpkema e coll., 1997; Strle e coll., 1997; Wang e coll., 1999; Ryffel e coll., 1999; Godfroid e coll., 2003; Collares-Pereira e coll., 2004; Diza e coll., 2004; Rudenko e coll., 2008, 2009b; Girard e coll., 2010).

Le diverse genospecie presentano un vario grado di omologia genomica con *B. burgdorferi* s.s. compreso tra il 44 e il 65%.

### 4.3 CICLO BIOLOGICO

La malattia di Lyme è una malattia trasmessa agli animali e all'uomo dal morso di zecche Ixodidae.

Le zecche vettrici presentano cicli biologici di 2 anni con 3 stadi di sviluppo, alimentandosi una sola volta in ogni stadio (Lane e coll., 1991). Le larve schiudono in estate e sono solitamente non infette con *B. burgdorferi* s. l., siccome la trasmissione transovarica è rara (Schoeler e Lane, 1993). La larva si può infettare alimentandosi su un ospite infetto per poi staccarsi per compiere la muta nell'ambiente. La ninfa riemerge la primavera successiva e può trasmettere l'infezione al nuovo ospite, oppure ingettarsi se ancora non lo era. Larve e ninfe si alimentano solitamente su piccoli mammiferi (roditori o lagomorfi) ma anche su uccelli, rettili e animali insettivori (Brisson e coll., 2008; Tsao, 2009). La ninfa rappresenta lo stadio più infettante, probabilmente perché è piccola e difficilmente individuabile sul corpo degli animali e dell'uomo, quindi la rimozione tempestiva non viene di solito effettuata (Shapiro e Gerber, 2000). Essendo piccola la ninfa si riempie di sangue più velocemente dell'adulto e quando raggiunge l'ingorgamento, il patogeno può essere trasmesso; inoltre le ninfe sono più frequenti in primavera ed estate, periodi in cui gli uomini e gli animali solitamente frequentano più assiduamente gli habitat delle zecche. Le ninfe mutano ad adulti in autunno. Gli adulti si alimentano su grossi mammiferi, come ad esempio il cervo dalla coda bianca in USA o altri ruminanti selvatici o domestici in Europa. Il ruolo dei ruminanti selvatici nella trasmissione di *B. burgdorferi* è spesso messo in discussione. Secondo alcuni autori non sembrano essere ospiti competenti per la trasmissione di *Borrelia* spp. (Telford III, 1988; Gern, 2008), infatti le zecche non acquisiscono l'infezione durante il pasto di sangue su questi animali (Rizzoli e coll., 2011). Secondo altri autori il cervo dalla coda bianca funge da serbatoio nel New England (Magnarelli e coll., 1991). La presenza e la densità di questi mammiferi influiscono però sulla densità delle zecche, essendo essi fonte di nutrimento (Tsao, 2009). La rimozione dei cervi in determinate aree ha determinato una notevole diminuzione delle zecche (Stafford III e coll., 2003; Rand e coll., 2004).

Le zecche possono acquisire il patogeno da ospiti competenti infetti o da altre zecche infette che si stanno alimentando nelle immediate vicinanze (trasmissione per co-feeding) sullo stesso ospite, anche se non infetto, o alimentandosi in un sito dove una zecca infetta ha appena concluso il pasto di sangue (trasmissione per co-feeding prolungato localizzato) (Tsao, 2009). Le zecche mantengono l'infezione anche in seguito alle mute, trasmettendo quindi il patogeno agli stadi successivi e ai nuovi ospiti su cui si alimentano (Rizzoli e coll., 2011).

All'interno della zecca, *Borrelia burgdorferi* manifesta un comportamento diverso da altri spirochete. Gli studi effettuati su *I. scapularis*, *I. ricinus* e *I. pacificus* hanno permesso di identificare un meccanismo di sviluppo prima sconosciuto tra le altre borrelie trasmesse da zecche o pidocchi. Al contrario delle altre specie di *Borrelia*, *B. burgdorferi* rimane a lungo nell'intestino della zecca dove si localizza a livello dei microvilli e degli spazi intercellulari (Burgdorfer e coll., 1989). La penetrazione a livello di cellule intestinali è il requisito fondamentale per la disseminazione sistemica del patogeno però non tutte le zecche che presentano l'infezione nell'intestino, manifestano anche la forma sistemica. Le percentuali di infezione

sistemica nelle zecche è stata studiata da diversi autori. In campionamenti eseguiti da Burgdorfer e coll. nel 1981 a Shelter Island, New York, tra le zecche raccolte il 61% presentava infezione solo a livello intestinale; in altre 208 zecche invece, infettate sia naturalmente che sperimentalmente, solo il 3,4% presentava l'infezione a livello sistemico con localizzazione nel ganglio centrale, nei tubuli Malpighiani, nelle ghiandole salivari e nell'ovaio (Burgdorfer e coll., 1989). In uno studio condotto in Svizzera, utilizzando *I. ricinus*, il 95% degli artropodi mostrava infezione solo a livello intestinale, il restante 5% presentava spirocheti nel ganglio centrale e nell'ovaio (Burgdorfer e coll., 1983). Percentuali di infezioni sistemiche maggiori sono state ritrovate in *I. pacificus*, il 32% delle zecche positive per *B. burgdorferi* presentava spirochete a livello sistemico (Burgdorfer e coll., 1985). In un altro studio di Burgdorfer e coll., (1989), il 66% delle zecche appartenenti alla specie *I. scapularis* raccolte a livello ambientale presentavano l'infezione solamente a livello intestinale. Una prevalenza maggiore di infezioni sistemiche è stata riscontrata in femmine di *I. scapularis*, infettate naturalmente e/o sperimentalmente, 6-8 settimane dopo l'ingorgamento. L'87% delle zecche è risultato infetto e tra queste il 24,6% presentava spirocheti in tessuti diversi da quello intestinale. Sembra che il batterio permanga e si moltiplichi a livello dei diverticoli e penetri la parete intestinale durante o dopo il pasto di sangue, diffondendosi per via sistemica principalmente al ganglio centrale, ai tubuli Malpighiani e all'ovaio (Burgdorfer e coll., 1989). Secondo questi autori l'infezione sistemica non è quindi un requisito fondamentale per la trasmissione del patogeno durante il pasto di sangue, in quanto i batteri vengono inoculati nella fase di rigurgito durante il pasto di sangue.

La trasmissione del patogeno dalla zecca all'ospite avviene principalmente dopo 48-72 ore dall'inizio del pasto di sangue (de Vignes e coll., 2001), quindi una rimozione tempestiva del vettore ne riduce il potere infettante (Khal e coll., 1998). L'individuazione delle zecche sul corpo sia dell'uomo che degli animali non è sempre facile, nel caso delle ninfe per le ridotte dimensioni, ma anche, nel caso degli adulti, per localizzazioni in zone del corpo alle volte poco ispezionabili (Húgli e coll., 2009).

Durante le fasi di alimentazione, alterazioni del pH e della temperatura dell'intestino della zecca attivano il batterio e stimolano l'espressione di diverse proteine di superficie (Schwan e coll., 1995; Carroll e coll., 1999; Haake, 2000). Il batterio inizia a moltiplicarsi e attraversa la parete intestinale, diffondendosi per via sistemica anche alle ghiandole salivari (Tilly e coll., 2008). La proteina OspC è coinvolta nel processo di colonizzazione delle ghiandole salivari e del tessuto cutaneo dell'ospite, dove sono presenti strutture di legame specifiche (Pal e coll., 2004; Grimm e coll., 2004). Questi meccanismi sono necessari alla trasmissione del patogeno (Leuba-Garcia e coll., 1994), ma alcuni sostengono che il trasferimento di *Borrelia* nell'ospite possa avvenire anche durante la rimozione delle zecche a seguito di pressioni dirette esercitate sull'intestino (Miyamoto e Hashimoto, 1998; Piesman e Dolan, 2002).

Un'altra via di trasmissione della malattia di Lyme negli animali potrebbe essere quella orizzontale attraverso l'inseminazione. Una prova di infezione sperimentale in cagne sia con l'inoculazione del patogeno, sia con inseminazione artificiale con seme infetto ha evidenziato in molte delle cucciolate un neonato presentava anticorpi IgM, ipotizzando quindi una trasmissione intrauterina del batterio, piuttosto che una infezione trans-placentare (Gustafson e coll., 1993). Il batterio resiste al

congelamento e allo stoccaggio, rendendo quindi il seme una fonte di infezione (Kumi-Diaka e Harris, 1995). Il sangue potrebbe essere un altro mezzo di trasmissione della malattia di Lyme, tuttavia, non sono ancora stati segnalati casi di infezione da trasfusione sia nell'uomo che negli animali (Bohme e coll., 1992; Gerber e coll. 1994).

#### 4.4 ECOLOGIA ED EPIDEMIOLOGIA

Il complesso *B. burgdorferi* s.l. attualmente comprende 18 genospecie (Stanek e Reiter, 2011; Rudenko e coll., 2011). Le diverse genospecie presentano ospiti e vettori differenti a seconda della localizzazione geografica e gradi di patogenicità variabili. *B. burgdorferi* s.s. è l'unica genospecie che causa malattia negli USA, mentre *B. garinii*, *B. afzelii* e occasionalmente *B. burgdorferi* s.s. sono responsabili della malattia di Lyme in Europa (Wang e coll., 1999; Weber, 2001). Alcuni autori segnalano infezioni ascrivibili a *B. valaisiana*, *B. bissettii* e *B. spielmanii* in Europa (Strle e coll., 1997; Rudenko e coll., 2008; Collares-Pereira e coll., 2004; Diza e coll., 2004; Maraspin e coll., 2006). In Cina la malattia è correlata a *B. garinii*, *B. afzelii* e raramente a *B. valaisiana* (Masuzawa e coll., 1996; Takada e coll., 2001; Saito e coll., 2007).

Generalmente le zecche che veicolano *Borrelia* spp. vivono in ambienti compresi tra il 33° e il 65° parallelo, tuttavia ci potrebbe essere uno spostamento più settentrionale della diffusione della malattia in seguito ai cambiamenti climatici (Lindgren e coll., 2000; Brownstein e coll., 2005). Le zecche coinvolte sono *I. ricinus* e *I. persulcatus* in Europa, *I. persulcatus* e *I. ovatus* in Asia, *I. scapularis* nella parte orientale e *I. pacificus* nella parte occidentale degli Stati Uniti (Wang e coll., 1999; Masuzawa, 2004; Killilea e coll., 2008).

Le larve e le ninfe si alimentano su diversi ospiti, tuttavia si riconoscono reservoir specifici di alcune genospecie. In USA *B. andersoni* viene riscontrata nel coniglio della Florida (*Sylvilagus floridans*) (Anderson e coll., 1989); *B. bissettii* sfrutta il ratto del legno (*Neotoma fuscipes*), il ratto del cotone (*Sigmodon hispidus*) e il topo *Peromyscus gossypinus* come serbatoi (Brown e Lane, 1992; Lin e coll., 2001). *B. burgdorferi* s.s. ha due gruppi di reservoir in base alla localizzazione geografica, nel nord-est degli USA è il topo dai piedi bianchi su cui si alimenta *I. scapularis* (Schutzer e coll., 1997a; 1998). Il cervo dalla coda bianca e il procione agiscono come serbatoi nel New England (Magnarelli e coll., 1991). Il ruolo dei cervi nell'incidenza della malattia è spesso messo in dubbio, tuttavia la rimozione degli stessi da un ambiente determina una notevole diminuzione delle zecche (Rand e coll., 2004). Altri autori però sostengono una correlazione più debole tra l'abbondanza di cervi e il rischio per la malattia di Lyme (Ostfeld e coll., 2006).

Nella parte occidentale degli USA, il ratto del legno e la lucertola *Sceloporus occidentalis* fungono da ospiti per rispettivamente *I. neotomae* e *I. pacificus* (Eisen e coll., 2004). Poiché la lucertola è immune alla borreliosi, non è coinvolta nella diffusione della malattia di Lyme (Lane e Quistad, 1998; Lane e coll., 2006), il ratto del legno è l'unico serbatoio attivo in questa regione ma *I. neotomae* non attacca l'uomo; *I. pacificus* è quindi l'unico vettore coinvolto nella trasmissione all'uomo. I

casi umani segnalati nella costa occidentale sono quindi rari e sono dovuti ad attacchi di *I. pacificus* che si è alimentata casualmente sui ratti (Doggett e coll., 2008).

In Europa i serbatoi sono meno specifici e sono costituiti da roditori, scoiattoli, ghiri, ricci e lepri (Humair e Gern, 2000). Il bisonte è il maggiore serbatoio in Polonia orientale (Sinski e coll., 1996). I roditori riconosciuti come reservoir per *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s. e *B. garinii* comprendono il topo dal collo giallo, il topo dei boschi (*Apodemus sylvaticus*), il topo domestico (*Mus musculus*) e alcune arvicole (*Myodes glareolus* e *Microtus arvalis*) (Khanakah e coll., 2006). *B. valaisiana* è specifica per gli uccelli quali fagiani e merli (Humair e coll., 1998; Kurtenbach e coll., 1998).

Nei territori asiatici i serbatoi sono spesso riconosciuti in roditori quali ad esempio *Apodemus agrarius* e *Rattus losea* (Zhang e coll., 2010).

Per quanto riguarda la circolazione nelle zecche, in Europa *B. afzelii* e *B. garinii* sono le più frequenti, seguite da *B. burgdorferi* s.s. e *B. valaisiana* (Rauter e Hartung, 2005), mentre *B. lusitaniae* ha una diffusione più focale, specialmente nel bacino del Mediterraneo (Vitorino e coll., 2008). Alcune genospecie possono anche presentarsi contemporaneamente in una stessa zecca (Rauter e Hartung, 2005).

Tutte le specie patogene causano la manifestazione cutanea della malattia (eritema migrante), alcune genospecie invece sono correlate a altre specifiche manifestazioni cliniche: *B. burgdorferi* s.s. è spesso associata ad artriti e sintomi neurologici, *B. garinii* determina neuroborreliosi e *B. afzelii* è associata all'acrodermatite cronica atropica (ECDC, 2010).

In Europa la distribuzione delle varie genospecie differisce sulla base di caratteristiche locali o regionali, sia temporali che spaziali con un'ampia biodiversità tra il 4° meridiano ovest e il 20° est, dove si registra la più alta prevalenza di zecche infette (Estrada-Peña e coll., 2011). Anche la distribuzione geografica dei casi di Lyme è irregolare: in Norvegia il 71% dei casi manifesta la forma neurologica, invece in Germania l'85% dei soggetti colpiti presenta la forma eritematosa migrante (Vorou e coll., 2007).

Negli Stati Uniti, le diverse manifestazioni cliniche sono associate a varianti di *B. burgdorferi* s.s. I ceppi isolati, secondo uno studio condotto da Brisson e coll. (2011), vengono classificati in base al genotipo ospC che ne contraddistingue la virulenza. I ceppi di *B. burgdorferi* s.s. analizzati sono stati ottenuti da zecche, da prelievi cutanei e dal sangue di pazienti con eritema migrante, nel liquido sinoviale di pazienti con la forma artritica o nel liquido cerebro-spinale di pazienti con sintomatologia neurologica. Dallo studio è emerso che la biodiversità del gene ospC è maggiore tra le zecche. Nelle biopsie cutanee è stato riscontrato almeno uno dei 16 genotipi di questo marcatore, alcuni genotipi sono risultati decisamente più frequenti (A, B, I, K e N). Negli altri campioni biologici si è riscontrata una minore variabilità genetica, con una prevalenza dei genotipi A e K (Brisson e coll., 2011).

Studi recenti riguardanti la prevalenza nelle zecche effettuati in Europa hanno riscontrato una prevalenza negli adulti di 18,6%, 10% nelle ninfe e 13,6% in totale (Rauter e Hartung, 2005). In particolare in Austria è stata riscontrata una prevalenza del 23,2%, in Svezia 29,6%, in Svizzera 30,8%, in Bulgaria 32,7%, 36,2% in Germania e 45% in Croazia (Gustafson e coll., 1989; Miserez e coll., 1990; Golubic e coll., 1998; Fingerle e coll., 1999; Christova e coll., 2001; Hubálek e coll., 2003).

In Nord America sono state effettuate indagini nel New Jersey, dove il 43% di

zecche adulte oggetto di studio hanno mostrato positività alla PCR (Varde e coll., 1998), in Maine riscontrando una prevalenza del 41% e in Connecticut dove il batterio è stato ritrovato nel 47% delle zecche (Dolan e coll., 2004; Rand e coll., 2004). In Ontario un tasso di infezione del 12,9% nelle zecche è stato segnalato da Morshed e coll. (2006). Uno studio più recente effettuato nella stessa area ha rivelato alla PCR una prevalenza del 67% di zecche positive per *B. burgdorferi* s.s. (Scott e coll., 2008).

Per quanto riguarda l'uomo, negli USA dal 1982 sono stati segnalati dal CDC 200.000 casi, 17.000 dei quali risalenti al triennio 1998-2001 (CDC, 2004). Nel 2002 il numero dei casi è salito a oltre 23.000, con un tasso di incidenza di 8,2 casi/100.000 abitanti. Circa il 95% dei casi sono stati registrati in 12 stati del nordest, medio Atlantico e regioni del centro nord degli USA: Connecticut, Delaware, Maine, Maryland, Massachusetts, Minnesota, New Hampshire, New Jersey, New York, Pennsylvania, Rhode Island, and Wisconsin (CDC, 2004).

Gli ultimi dati epidemiologici indicano che i casi annuali di Lyme nel Mondo sono 85.000 dei quali 65.000 in Europa, 16.500 in USA, 3.500 in Asia (Hubalek, 2009).

Una reale descrizione epidemiologica della malattia di Lyme in Europa non è tuttora possibile in quanto pochi paesi hanno reso denunciabile la malattia (Vorou e coll., 2007; Hubalek, 2009 Semenza e Menne, 2009). Non ci sono piani di monitoraggio a livello europeo e la sorveglianza statistica dei casi è basata su sistemi non standardizzati di raccolta dati (Lindgren e Jaenson, 2006; Smith e Takikinen, 2006). Inoltre i dati sono poco accurati in quanto pazienti con eritema migrante o altri sintomi spesso non sono notificati, i criteri per le indagini sierologiche non sono standardizzati e report dalle aree più remote spesso sono carenti (Ogrinc e coll., 2008). In aggiunta a queste problematiche c'è anche da considerare che i pazienti potrebbero essere infetti con due genospecie contemporaneamente, manifestando sintomatologie eterogenee che complicano la sorveglianza (Wilske e coll., 2007).

L'incidenza annuale in Europa è aumentata da 1 caso su 100.000 a circa 350 casi su 100.000 abitanti. La localizzazione della malattia di Lyme si registra generalmente tra il 35° e il 60° parallelo Nord, so tto altitudini di 1.300 metri slm. La distribuzione spaziale è molto eterogenea ma la prevalenza di anticorpi per il complesso *B. burgdorferi* s.l. è maggiore negli abitanti dei paesi settentrionali e centrali (Rizzoli e coll., 2011). Si segnalano situazioni localizzate in cui si rileva un'incidenza di più di 100 casi su 100.000 abitanti l'anno, ad esempio in alcune aree slovene, tedesche, austriache, nella costa Baltica della Svezia e in alcune isole finlandesi ed estoni (Rizzoli e coll., 2011). Un aumento dell'incidenza del 33% è stato registrato in Germania nel 2002, passando da 17,8 casi/100.000 abitanti a 23,3/100.000 (Mehnert e Krause, 2005). In Norvegia il numero più alto di casi è stato segnalato nel 2004 (253 in totale) (Nygard e coll., 2005). Anche nel Regno Unito si è registrato un aumento dei casi segnalati di borreliosi da 0.38 per 100.000 abitanti nel 2000 a 1,79 per 100.000 nel 2009 (Smith e coll., 2002).

Il rischio di contrarre la malattia di Lyme è correlato all'abbondanza di zecche e alla possibilità di esposizione alle stesse. Il rischio maggiore può essere correlato al tipo di lavoro (forestale e agricolo) ma soprattutto alle attività ricreative (caccia, raccolta di funghi e frutti selvatici) o all'età, con due categorie di soggetti maggiormente colpiti: bambini tra 5 e 14 anni e adulti tra 50 e 64 anni (Rizzoli e coll., 2011).

La maggiore frequenza dei casi di borreliosi si manifesta tra giugno e luglio in molti paesi del Nord e Centro Europa, un altro picco di entità inferiore può verificarsi a

fine estate o in autunno nelle zone più meridionali del continente; tuttavia sia l'eritema migrante che le forme croniche possono essere riscontrate durante tutto l'anno (Hubalek, 2009).

La malattia di Lyme è stata ampiamente studiata nell'uomo, nel cane invece non è presente lo stesso interesse, nonostante le caratteristiche siano simili tra le due specie (Skotarczak, 2002). Per quanto riguarda questo animale, spesso viene segnalata una positività anticorpale nei confronti di *B. burgdorferi* in aree in cui si registrano casi di Lyme nell'uomo.

I dati relativi alla diffusione di *B. burgdorferi* nel cane sono pochi e spesso sono ottenuti da indegini sierologiche. I cani che risultano positivi nel 86% dei casi non manifestano sintomatologia clinica (Goossens e coll., 2001), questa sovrastima può essere dovuta anche a cross-reazioni tra *B. burgdorferi* e altri batteri correlati (*Treponema* spp., *Bradyspira* sp. e *Leptospira* spp.) (Skotarczak, 2002). In USA la presenza di anticorpi nei cani è segnalata nell'11,6% dei soggetti nella parte nord-orientale del paese, con prevalenze > del 40% in zone in cui la malattia era più diffusa nell'uomo (Bowman e coll., 2009). Nella parte occidentale degli Stati Uniti è stata registrata una prevalenza del 1,2% nei cani testati (Carrade e coll., 2011).

In Europa si segnalano prevalenze del 6,5% in Romania (Kiss e coll., 2011); in Turchia uno studio riporta una prevalenza del 27,7% al test ELISA (Bhide e coll., 2008); in Serbia 25,8% (Savić e coll., 2010); in Francia Bourdeau (2008) rileva una prevalenza annua di 0,03-0,06 casi/1000 cani con un'incidenza annuale di 0,5 casi/1000. In Repubblica Ceca, valutando la presenza di IgG contro *B. burgdorferi* s.l., è stata riscontrata una prevalenza in cani del 10,3%.

Per quanto riguarda il cavallo, negli USA ci sono pochi dati relativi all'epidemiologia della malattia di Lyme, ma si suppone siano simili a quelli registrati nell'uomo (Divers, 2007). Nel medio Atlantico e nel Nord-Est presentano prevalenze elevate, come anche in Minnesota e in Wisconsin. Rare segnalazioni si registrano negli stati Dakota e nel Nebraska. In New England un'indagine ha riscontrato la presenza di anticorpi verso *Borrelia* nel 45% dei cavalli (Magnarelli e coll., 2000a), mentre in uno studio effettuato in Wisconsin, 118 cavalli su 190 sono risultati positivi (Burgess, 1988). Un altro studio americano riporta prevalenze nei cavalli dal 13 al 24% in aree in cui la malattia è endemica (Bernard e coll., 1990).

In Europa i dati epidemiologici vengono registrati in Francia (Maurizi e coll., 2010) con una prevalenza che va dal 31 al 48% nelle regioni centro-occidentali e in quelle orientali; in Danimarca dove il 29% dei cavalli testati è risultato positivo per la presenza di anticorpi verso *B. burgdorferi* s.l. (Hansen e coll., 2010); in Turchia dove si registra una prevalenza del 6,3% (Bhide e coll., 2008); in Germania con il 16,1% (Käsbohrer e Schönberg, 1990), in Svezia 16,8% (Egenvall e coll., 2001); in Polonia dove sono stati riscontrati positivi il 25,6% dei cavalli (Stefanciková e coll., 2008) e in Slovacchia il 47,8% (Stefanciková e coll., 2000).

In Italia dati epidemiologici per la malattia di Lyme riguardano principalmente le aree nord-orientali e centro-meridionali del paese.

Santino e coll. (2004) hanno rilevato una positività del 7,5% nei lavoratori considerati a rischio nelle zone del centro e sud Italia. Un'indagine era stata condotta anche all'interno del Parco Nazionale d'Abruzzo, eseguendo analisi sierologiche sui lavoratori del parco; il 9% ha presentato anticorpi per *B. burgdorferi* al test ELISA (Santino e coll., 1998). In Abruzzo è stato condotto anche un piano di sorveglianza della malattia di Lyme negli anni 1994-1999: in questi anni 29 pazienti

su 769 esaminati sono risultati positivi (Fazii e coll., 2000). Dati forniti all'Ospedale Umberto I di Roma riportano una prevalenza sierologica del 7,5% (Santino e coll., 2008). In Toscana sono stati sottoposti a controllo sierologico dei lavoratori agricoli e forestali, tra i quali è stata riscontrata una positività 7,8% dei soggetti (Tomaio e coll., 2005). Sempre in Toscana, ma in uno studio condotto a Firenze presso gli ospedali "Nuovo San Giovanni di Dio" e "Careggi", è stata riscontrata una prevalenza del 12,6% tra le persone che si erano presentate all'ospedale in seguito a morso di zecca (Ciceroni e coll., 2003). Ventitré casi di eritema migrante sono stati segnalati in Calabria tra il 1999 e il 2002, mostrando anche un andamento stagionale differente rispetto alle aree endemiche per la malattia di Lyme, molti dei casi infatti sono stati individuati tra Ottobre e Dicembre (Greco e coll., 2003).

Altri autori riportano invece i dati inerenti al Friuli-Venezia Giulia, negli agenti della forestale, dove hanno segnalato una positività del 23,2% (Cinco e coll., 2004). In questa regione la malattia di Lyme è abbastanza diffusa dal 1986 (Trevisan, 1987) ed è stata riscontrata una prevalenza nelle zecche del 70% (Cinco e coll., 1998) e una sieroprevalenza nella popolazione del 20% (Cinco e coll., 1993). Nel periodo 2000-2002 sono stati registrati 80-100 casi l'anno (Cinco e coll., 2004) e 218 tra il 2000 e il 2005, con un'incidenza di 0.58 casi/1000 abitanti/anno (Nazzi e coll., 2010). In Emilia Romagna, un'area endemica grazie alla presenza di laghi, boschi e zone paludose, sono stati registrati 722 casi dal 1996 al 2007 (Pavan, 2009). Segnalazioni di positività sierologiche sporadiche provengono anche dal Piemonte (Pugliese e coll., 2007).

Per quanto riguarda le zecche in Italia, alcuni lavori riportano prevalenze del 18% in Lombardia (Pistone e coll., 2010), di più del 20% nelle Alpi orientali (Nazzi e coll., 2010) ; di 1,32% nella provincia di Trento (Mantelli e coll., 2006). In uno studio condotto in Toscana, *B. burgdorferi* s.l. è stato identificato nel 16,7% delle ninfe e nel 39,6% degli adulti di *Ixodes ricinus* campionati; le indagini molecolari effettuate hanno permesso di identificare *B. lusitaniae* nell'82,9% dei campioni positivi, *B. garinii* nel 9,8%, *B. afzelii* e *B. burgdorferi* s.s. nel 2,4% delle zecche positive (Bertolotti e coll., 2006). *B. valaisiana* è stata invece segnalata in pool di zecche in Veneto (Favia e coll., 2001).

In Italia è stato segnalato un caso di Lyme in un cane pitbull in Sicilia (Giudice e coll., 2003).

## 4.5 PATOGENESI

La trasmissione delle spirochete della malattia di Lyme dalla zecca agli ospiti vertebrati avviene durante il pasto di sangue. I batteri presenti a livello intestinale si moltiplicano e subiscono cambiamenti fenotipici, compresa l'inibizione della proteina OspA e la stimolazione dell'espressione della proteina OspC (Schwan e coll., 1995) che permette la penetrazione nelle ghiandole salivari della zecca. Il processo richiede alcuni giorni, per questo motivo la trasmissione dell'infezione non è immediata. L'espressione dell'OspC è fondamentale nell'instaurarsi dell'infezione nell'ospite mammifero, sebbene il meccanismo con cui questo gene favorisca l'invasione non sia ancora chiarito (Steer e coll., 2004; Rosa, 2005). Il tempo di



trasmissione del patogeno dalla zecca al vertebrato è variabile in funzione della specie di *Borrelia* che è presente nella zecca e della localizzazione dell'infezione all'interno della zecca stessa. In caso di intensa infezione sistemica all'interno del vettore (Lebet e Gern, 1994), la trasmissione avviene in tempi più brevi, inoltre sembra che *B. afzelii* si trasmetta prima di *B. burgdorferi* s.s. (Crippa e coll., 2002). In generale, occorrono almeno 53 ore di pasto di sangue affinché siano presenti un numero di batteri sufficienti all'infezione (Ohnishi e coll., 2001).

Durante il pasto di sangue la zecca infetta deposita nella pelle dell'animale ospite le spirochete che poi andranno a disseminarsi attraverso i tessuti e il circolo ematico. La diffusione per via ematica è influenzata dal ceppo di *Borrelia* presente (Wormser e coll., 2008). Generalmente dopo il morso le spirochete si moltiplicano nel sito di inoculo e si diffondono nei tessuti adiacenti. Successivamente localizzano altri tessuti, compresi quelli articolari. La migrazione attiva attraverso i tessuti è più frequente che non quella passiva per via ematica (Greene e Straubinger, 2006).

L'infezione provoca una risposta immunitaria sia mediata da macrofagi che da anticorpi che uccidono le spirochete. Nonostante sia presente una buona reazione dell'organismo, l'infezione può procedere grazie a fattori di virulenza del batterio che inibiscono l'espressione di alcune proteine immunogene e a continue ricombinazioni delle proprietà antigeniche di una lipoproteina di superficie VlsE (variable major protein-like sequence expressed), utilizzata anche nella diagnosi sierologica e che aumenta negli ultimi due giorni del pasto di sangue (Piesman e coll., 2003). La capacità, inoltre, che hanno questi batteri di legarsi a componenti della matrice extracellulare possono contribuire alla persistenza dell'infezione (Steere e coll., 2006; Cabello e coll., 2007; Baranton e De Martino, 2009).

Il sistema immunitario gioca un ruolo fondamentale nella patogenesi della malattia di Lyme. Le lipoproteine batteriche sono potenti attivatori del sistema immunitario innato e attivano i recettori "Toll-like" (TLRs) 1 e 2 (Salazar e coll., 2003) in un sistema CD14-dipendente; i topi con carenza di TLR2 o di antigene di differenziazione mieloide 88 (MyD88) presentano una carica infettante maggiore (Bolz e coll., 2004).

Questi batteri non producono tossine e il danno tissutale sembra essere il risultato della reazione infiammatoria dell'ospite. L'intensità della risposta varia in funzione della genospecie di *Borrelia* coinvolta (Strle e coll., 2009).

Sebbene il numero di persone e animali morsi da zecche siano molti, solo alcuni sviluppano la malattia, grazie alla reazione immunitaria che ne previene l'instaurarsi (Greene e Straubinger, 2006). Dalla prospettiva della zecca, nelle zone endemiche circa il 50% dei vettori può essere infetto, tuttavia solo il 2% della popolazione colpita da morso diventa infetta. La causa è spesso dovuta al fatto che la zecca viene rimossa tempestivamente. Anche nei cani la percentuale di soggetti che manifesta la forma clinica è bassa (5-10%) in confronto al livello di esposizione riscontrabile con indagini sierologiche (75% nelle aree endemiche) e il tasso di infezione nelle zecche (Levy e Magnarelli, 1992).

All'interno dell'organismo *B. burgdorferi* agisce come un patogeno persistente. Le spirochete vivono a livello extracellulare e, attraverso un meccanismo ancora non conosciuto, possono evadere la risposta immunitaria per lunghi periodi nella pelle, nel connettivo, nelle articolazioni e nel sistema nervoso (Greene e Straubinger, 2006). Le borrelie oltre a modificare l'espressione antigenica possono anche mutare la morfologia, batteri spiraliformi e motili possono diventare sferici entro pochi minuti

dall'incontro di condizioni ambientali non favorevoli (Brorson e Brorson, 1997; Alban e coll., 2000). In questa forma possono sopravvivere per giorni senza nutrirsi e ritornano alla forma originale quando le condizioni ambientali sono migliorate. È stato dimostrato che le forme sferiche possono infettare il topo (Gruntar e coll., 2001). Questo può spiegare come mai il batterio può essere ritrovato nei tessuti, attraverso la PCR o le colture, anche dopo mesi di trattamento antibiotico. Viceversa dopo alcune settimane dall'infezione è difficile individuare e isolare *B. burgdorferi* dai fluidi biologici o dagli organi interni di ospiti accidentali come il cane (Appel e coll., 1993).

Alcuni eventi immunopatologici possono essere collegati alla risposta immunitaria generatasi contro specifici antigeni. La flagellina, una delle proteine immunogene più importanti, può stimolare un anticorpo che si lega alle proteine neuroassonali dell'ospite (Sigal e Williams, 1997). Questo evento può stimolare la risposta infiammatoria del tessuto nervoso. Nel liquor di persone con neuroborreliosi iniziale è stato osservato l'accumulo di cellule T CD8+ (Jacobsen e coll., 2003). Il rilascio di citochine può aiutare l'organismo nell'eliminazione del patogeno ma ne risulta anche un danno al sistema nervoso. PCR eseguite sul liquido sinoviale di pazienti umani infetti sono spesso positive, in quanto permettono di rilevare geni plasmidici codificanti per OspA, OspB e OspC (Persing e coll., 1994). La risposta infiammatoria a poche spirochete può essere spiegata da una replicazione autonoma di DNA plasmidico (Wormser e coll., 1999). Aumenti di IL-8, che determina il reclutamento di neutrofili nel sito di infiammazione, sono stati riscontrati nelle membrane sinoviali di cani infettati sperimentalmente (Straubinger e coll., 1997). Questo meccanismo può essere coinvolto nelle poliartriti suppurative. In alcuni animali lo sviluppo di artriti può essere correlato al perpetuarsi di reazioni immunitarie. Persone con alcuni aplotipi del complesso maggiore di istocompatibilità sono soliti a manifestazioni cliniche più gravi e più resistenti al trattamento antibiotico (Steere e coll., 2006).

Il tessuto d'elezione per la localizzazione delle borrelie varia in funzione della specie coinvolta, condizionando anche la patogenicità e le manifestazioni cliniche. *B. garinii* ad esempio è stata riscontrata nel fegato di cani con elevata attività enzimatica, un rinvenimento non riscontrato in infezioni da *B. burgdorferi* s. s. (Hovius e coll., 1999).

## 4.6 SINTOMATOLOGIA

### 4.6.1 MALATTIA DI LYME NELL'UOMO

La malattia di Lyme può manifestarsi in forma acuta o cronica, con grandi variazioni dovute alla genospecie o al genotipo coinvolti nell'infezione (Wormser e coll., 2008). La forma clinica della borreliosi di Lyme è caratterizzata da 3 stadi, durante quali il batterio si localizza in diversi tessuti dell'ospite e ne determina i diversi sintomi (Bhate e Schwartz, 2011a).

**Primo stadio o forma precoce:** è caratterizzato da eritema migrante (EM), che permane per 1-3 settimane nel sito in cui la zecca ha inoculato il patogeno (Steere,

2001). Inizialmente si ha la presenza, spesso nel sito di attacco della zecca, di una macula eritematosa o una papula che diffonde in modo centrifugo di circa 3 cm al giorno e può sviluppare un alone centrale. La dimensione della macula è in funzione della sua durata; il diametro medio è di 10-16 cm, in genere è maggiore quando presente sul tronco e inferiore a livello di estremità (Mülleger, 2004). Solo il 50% degli adulti e il 90% dei bambini presenta il classico EM con alone centrale rendendolo un rilievo importante ma non fondamentale (Steere, 2001). L'eritema può anche manifestarsi senza alone centrale o può presentare petecchie (Smith e coll., 2002). Inoltre, in due studi è stato evidenziato che solo il 25% dei pazienti degli USA erano in grado di ricordare un precedente morso di zecca (Nadelman e coll., 1996; Strle e coll., 1999). Altri sintomi associati possono essere affaticamento, febbre, mal di testa, dolore e prurito nel sito di inoculo o linfadenopatia regionale (Bhate e Schwartz, 2011a).

In Europa l'eritema migrante si presenta quasi indolente e tende ad essere meno evidente (Strle e coll., 1999). Circa il 64% dei pazienti in genere ricorda una precedente puntura di zecca (Strle e coll., 1999). Esistono differenze tra l'EM causato da *B. afzelii* e quello causato da *B. garinii*. Quest'ultima specie determina la formazione precoce dell'eritema, una sua crescita rapida e sono associati molti sintomi sistemici (Logar e coll., 2004). L'EM da *B. afzelii* presenta in genere l'alone centrale (Carlsson e coll., 2003).

Questo sintomo cutaneo della malattia di Lyme regredisce in settimane o mesi se non curato (Steere e coll., 1987).

**Secondo stadio o forma tardiva:** la malattia progredisce verso una forma disseminata, generalmente con eritemi migranti multipli e sintomi di coinvolgimento di molti organi, in particolare cuore e sistema nervoso. La comparsa della forma disseminata si presenta in tempi variabili, può iniziare nella prima settimana di infezione o presentarsi dopo mesi (Kaiser, 1998; Pinto, 2002; Mülleger, 2004). Periodi asintomatici sono comuni. Molti pazienti con la Lyme disseminata presentano eritemi migranti multipli che sono di solito più piccoli, meno caratteristici e possono comparire contemporaneamente o subito dopo la scomparsa dell'EM originario (Steere e coll., 1983). Una piccola percentuale di pazienti ha la disseminazione ematica di spirochete ma senza manifestare gli eritemi multipli, suggerendo che se i casi clinici non presentano complicazioni, il primo stadio della malattia può passare inosservato (Wormser e coll., 2005).

In Europa l'eritema può persistere come una placca o un nodulo che coincide con lo sviluppo di un linfocitoma cutaneo (LCC) (Chodyncka e coll., 2000). Il linfocitoma cutaneo, conosciuto anche come linfadenosi benigna cutanea, si presenta generalmente come un nodulo di 1-5 cm solitario, rosso-violaceo localizzato nel lobo auricolare o nello scroto nei bambini e nel torace o nei capezzoli negli adulti (Chodyncka e coll., 2000; Mülleger, 2001). Questo sintomo può manifestarsi entro le prime settimane dalla puntura di zecca ed è solitamente correlato al secondo e terzo stadio della malattia (Pohl-Koppe e coll., 1998). Il linfocitoma può anche comparire nelle fasi iniziali dell'infezione nel sito di inoculo, precedendo occasionalmente l'EM (Mülleger, 2001). Le localizzazioni riscontrate in genere riflettono i siti di trasmissione iniziale, ma possono anche rappresentare aree con temperatura corporea inferiore, dove le borrelie preferiscono rimanere (Chodyncka e coll., 2000). Il linfocitoma cutaneo è uno pseudolinfoma che può ricordare un linfoma cutaneo primario, la diagnosi e l'approccio terapeutico sono quindi

fondamentali (Grange e coll., 2002).

**Terzo stadio:** le manifestazioni dermatologiche in questo stadio della malattia di Lyme si riscontrano solo in infezioni contratte in Europa. L'acrodermatite cronica atrofica (ACA) è un segno clinico tardivo (Chodyncka e coll., 2009). Non è mai stato associato a pazienti statunitensi ed è spesso correlato ad infezioni con *B. afzelii* (Steere e coll., 2001). Questa forma clinica è rara nei bambini (Oldak e coll., 2009), può presentarsi negli adulti e la comparsa è insidiosa, può avvenire anche dopo mesi o anni dal morso della zecca (Flisiak e coll., 1999). Solo il 20% dei pazienti manifesta prima l'EM, ma molti ricordano un'esposizione in aree forestali o erbose. L'ACA in genere inizia come uno stadio infiammatorio caratterizzato da placche che tendono ad allargarsi, edematose e scarsamente demarcate con colorazioni rosso-violacee nelle estremità distali (Asbrink, 1985). Queste aree possono essere piccole, localizzate ad esempio ad un dito del piede, ma possono anche espandersi in direzione prossimale (Chodyncka e coll., 2009). Se non trattata questa forma clinica in alcuni anni evolve ad una fase atrofica caratterizzata da cute iperpigmentata o cute traslucida, glabra e rugosa; inoltre possono comparire noduli fibrotici violacei o giallognoli in prossimità delle grandi articolazioni come gomiti e ginocchia. L'ACA può presentarsi anche sul tronco e raramente sul viso (Chodyncka e coll., 2009).

È stata riscontrata una evidente associazione tra la malattia di Lyme e i linfomi cutanei maligni (Monari e coll., 2007; Eisendle e Zelger, 2009). Pazienti con infezioni croniche e stimolazione linfatica prolungata possono sviluppare noduli eritematosi e tumori alle estremità, caratterizzati da crescita lenta e scarsa definizione. È stata dimostrata la presenza di infiltrazione da cellule B, caratteristica del linfoma a cellule B. La presenza dell'acrodermatite può indicare la possibile coesistenza di malignità cutanea (Garbe e coll., 1988). Sfortunatamente questi tumori non regrediscono con la terapia antibiotica impiegata nel trattamento della LD (Garbe e coll., 1988).

Alcuni pazienti sviluppano la morfea, o sclerodermia localizzata, in concomitanza o dopo l'acrodermatite; il ruolo delle borrelie nello sviluppo della morfea non è tuttora chiaro (Hercogová, 2002), infatti, dalla prima sua prima descrizione nel 1985 in pazienti con la LD, questa forma è oggetto di controversie (Aberer e coll., 1985). Pazienti con la malattia di Lyme possono anche sviluppare il lichene sclerotico e atrofico (LSA). Sia la morfea che il lichene sono rari nei pazienti statunitensi, ma frequenti in Europa ed Asia (Fujiwara e coll., 1997).

**Manifestazioni neurologiche:** la sintomatologia neurologica può comparire alcune settimane dopo l'EM (Kaiser, 1998). Il sistema nervoso può essere coinvolto sia per via ematica che per diffusione attraverso i nervi periferici e i vasi linfatici nelle vicinanze del sito di inoculo (Rupprecht e coll., 2008). L'invasione del liquor stimola la produzione di citochina infiammatorie in aggiunta a chemiochine specifiche dei linfociti T e B (Rupprecht e coll., 2008). *B. garinii*, la genospecie più neuro invasiva, induce il CXCL13, una chemiochina specifica delle cellule B, considerata un marker liquorale della malattia di Lyme (Rupprecht e coll., 2007). Questa stimolazione può determinare una nuova espressione delle lipoproteine OspA e OspC, gli anticorpi verso queste proteine sono stati riscontrati nel liquido cefalo-rachidiano di persone con neuroborreliosi precoce (Schutzer e coll., 1997b).

La triade meningite linfocitaria, neurite craniale e radiculoneurite caratterizza le fasi iniziali della neuroborreliosi nel 12-15% dei pazienti (Bacon e coll., 2008). Le

manifestazioni della meningite comprendono mal di testa, indolenzimento cervicale e difficoltà di concentrazione. I sintomi causati dal coinvolgimento dei nervi periferici includono dolore alle radici, paralisi facciali e altri deficit nervosi (Pachner e Steere, 1985). Paralisi di Bell, o paralisi facciale, in aree endemiche può indicare un caso di Lyme (Ljostad e coll., 2005). Le radiculopatie determinano sintomi non specifici, quindi la diagnosi di Lyme è spesso trascurata; possono, infatti, determinare dolore asimmetrico agli arti inferiori seguito da paresi con gravità maggiore nel lato del morso della zecca (Kaiser, 1998). Quasi tutti i nervi craniali possono essere coinvolti. Raramente c'è un coinvolgimento vestibolococleare che si manifesta con vertigini o perdita dell'udito (Peltomaa e coll., 1998; 2000). Possono verificarsi anche paralisi dell'oculomotore e neuriti ottiche complicate da edema (Karma e coll., 1995; Kaiser, 1998).

La neuroborreliosi se non trattata si risolve nel giro di alcuni mesi, ma nel 5% dei casi progredisce alla forma cronica dopo uno o più anni dall'infezione (Pachner e Steere, 1985). La forma cronica è una componente del terzo stadio della LD. Sia in USA che in Europa i sintomi sono: radiculopatie, plessopatie brachiali o lombosacrali, polineuropatia sensoria con parestesia, iperestesia e iperalgesia (Pachner e Steere, 1985; Kaiser, 1998). La polineuropatia, in genere di tipo assonale, coinvolge le estremità distali e può essere associata all'acrodermatite (Pachner e Steere, 1985; Kaiser, 1998). Sono stati segnalati anche casi di emiparesi e mieliti acute (Olivares e coll., 1995).

**Manifestazioni reumatologiche:** sintomi di artralgia possono verificarsi in un terzo dei pazienti con malattia di Lyme acuta (Bacon e coll., 2008). Nel decorso clinico i pazienti possono presentare dolore articolare assieme a mialgia. La forma reumatologica si manifesta come un'artrite intermittente migrante con eventuali localizzazioni asimmetriche, ad esempio a livello di ginocchio (Steere e coll., 1977a; b). Il quadro clinico può comprendere effusioni non purulente e deformità delle articolazioni con dolore moderato. Alcuni pazienti con LD confermata rispondono bene alla terapia antibiotica, alcuni evolvono verso forme di degenerazione articolare e altri possono manifestare sintomi di coinvolgimento articolare persistenti e non specifici (Grygorczuk e coll., 2008). È stato dimostrato che esiste una correlazione tra la resistenza al trattamento e genotipi umani che presentano gli antigeni leucocitari (HLAs) DR4 e DRB1 (Steere e coll., 2001).

**Manifestazioni cardiache:** le infiammazioni cardiache sono un sintomo poco comune della malattia di Lyme con una prevalenza di circa l'8% (Peltomaa e coll., 2002). Possono presentarsi nel secondo stadio a seguito della disseminazione sistemica (Pinto, 2002). La più comune manifestazione clinica è un blocco atriventricolare di primo grado (Lo e coll., 2003). Possono verificarsi anche blocchi di secondo grado o completi, ritmo giunzionale e pause sistoliche. Altre alterazioni, caratteristiche degli stadi avanzati della malattia, comprendono miocarditi, cardiomiopatie dilatative e insufficienza cardiaca (Bartunek e coll., 2006). La degenerazione cardiaca può essere collegata a problematiche autoimmunitarie come ad esempio la cross-reattività verso la miosina dell'ospite, individuate in modelli murini (Raveche e coll., 2005).

Le donne in stato di gravidanza, affette da malattia di Lyme, presentano la sintomatologia clinica classica (Walsh e coll., 2007). Sono stati segnalati diversi casi di complicanze fetali associate a LD gestazionale (Schlesinger e coll., 1985; MacDonald e coll., 1987). Queste segnalazioni hanno posto il quesito di un

probabile effetto teratogeno della malattia di Lyme, tuttavia una relazione causale non è ancora stata dimostrata (Williams e coll., 1995). La trasmissione transplacentare è stata dimostrata ma ancora non è chiaro se ha effetti sulla malformazione e sulla morte fetale (Walsh e coll., 2007).

Oltre a *Borrelia burgdorferi*, le zecche possono trasmettere altri agenti di zoonosi come HGA e babesiosi (Krause e coll., 2002), già trattati nei precedenti capitoli. La prevalenza di infezioni duplici o triplici ha variabilità regionale e riflette la situazione epidemiologica di ogni malattia in una determinata area (Swanson e coll., 2006).

In America tassi di infezione nelle zecche ad opera di *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* e *Babesia microti* possono raggiungere il 28% (Swanson e coll., 2006). Molte coinfezioni nella zecca riportano la presenza di *B. burgdorferi* e *A. phagocytophilum* (Swanson e coll., 2006); al contrario nell'uomo si registrano più facilmente infezioni miste da LD e babesiosi: uno studio relativo ad un'area endemica per *Babesia* riporta che un terzo dei pazienti affetti da malattia di Lyme presentavano positività sierologica per babesiosi (Benach e coll., 1985). Tuttavia anche l'anaplasmosi deve essere tenuta in considerazione nei casi di Lyme, perché circa il 26% dei affetti provenienti da aree endemiche, presenta evidenza sierologica di doppia infezione (Aguero-Rosenfeld e coll., 2002).

In Europa infezioni sia nelle zecche che nell'uomo con *Borrelia*, *Babesia* e *Anaplasma* sono meno frequenti, con dati di prevalenza del 13% (Christova e coll., 2001) e del 17% (Brouqui e coll., 1995) rispettivamente. In Asia infezioni tra gli ospiti sono rare (Swanson e coll., 2006).

#### 4.6.2 MALATTIA DI LYME NEGLI ANIMALI

**Cane:** studi sulle manifestazioni cliniche della malattia di Lyme nel cane, come nel gatto, sono stati fatti a seguito di infezioni indotte sperimentalmente utilizzando zecche infette (Appel e coll., 1993). La forma clinica nei cani infettati sperimentalmente si manifesta 2-6 mesi dopo l'esposizione e la gravità dei sintomi sembra variare inversamente rispetto all'età degli animali e dello stato immunitario. La comparsa della malattia coincide generalmente con l'aumento degli anticorpi (Greene e Straubinger, 2006).

I sintomi clinici di carattere sistemico sono: febbre alta (39,5-40,5°C), zoppia itinerante, dolore articolare, linfadenomegalia, anoressia e malessere generale. Tutti sintomi che rispondono alla terapia antimicrobica e che si riscontrano frequentemente nei cani infetti (May e coll., 1990; Levy e coll., 1993). La diagnosi spesso non è accurata dato che i segni clinici agli arti e alle articolazioni (dolore, gonfiori e zoppie) associati a febbre e inappetenza sono stati osservati con frequenza uguale in cani con e senza anticorpi specifici per *B. burgdorferi* (Magnarelli e coll., 1987; Cerri e coll., 1994).

L'artrite è la sindrome più segnalata nelle infezioni acute. La diffusione del batterio nella pelle, nel connettivo e nel tessuto muscolare è probabilmente la principale causa di zoppie. Il primo arto coinvolto è generalmente quello più vicino al sito di inoculo. L'inizio della zoppia può coincidere con l'aumento della temperatura. La zoppia può persistere in un arto per alcuni giorni poi spostarsi in un altro o scomparire. Nonostante l'artrite sembri passeggera, le modificazioni a livello articolare sono progressive. Poliartriti croniche non erosive, riscontrate in molti

animali non sottoposti a trattamento o con infezioni prolungate, possono permanere anche in seguito a terapia antibiotica.

Nel cane quindi le lesioni si riscontrano maggiormente nella pelle, nel tessuto linfatico e nelle articolazioni anche se l'organismo può essere isolato da altri tessuti e liquidi corporei (Greene e Straubinger, 2006).

In alcuni cani infettati sperimentalmente è stata segnalata una glomerulo nefrite proteino-disperdente (Grauer e coll., 1988).

In 49 cani di un'area endemica per *Borrelia* sono stati riscontrati danni renali acuti progressivi associati ad azotemia, uremia, proteinuria, edema periferico ed effusioni (Dambach e coll., 1997). Le razze più colpite, secondo questo studio, erano labrador e golden retrievers. La malattia presentava una durata compresa tra 24 ore e 8 settimane, con una successiva comparsa di anoressia, vomito, letargia e perdita di peso. Tutti i cani presentavano anticorpi verso *B. burgdorferi* e morirono o furono soppressi a causa del danno renale.

Nel cane sono state segnalate manifestazioni neurologiche in seguito a infezioni sperimentali: i soggetti presentavano moderati segni di meningite focale, encefalite e polineuriti (Chang e coll., 2001).

Altri sintomi segnalati sono: lesioni rossastre nel sito di attacco della zecca che scompaiono entro la prima settimana; artriti reumatoidi; aritmie indotte da miocarditi.

**Gatto:** nonostante sia stata segnalata la positività sierologica, per questa specie non è stata descritta la forma clinica. I gatti sembrano essere più resistenti alla Lyme. Prove di infezione sperimentale con spirochete coltivati hanno provocato sieropositività anticorpale, tuttavia il patogeno è stato riscontrato solo nel sangue. La batteriemia si presentava transitoria, scomparendo entro il 24 giorno e solo un gatto presentava il batterio nei tessuti all'esame autoptico (Burgess, 1992). Nel caso in cui i gatti invece si infettano utilizzando direttamente le zecche, svilupparono zoppia e segni di infiammazione articolare, polmonare, linfatica e nervosa alla necropsia (Gibson e coll., 1995).

**Cavallo:** i segni clinici associati alla malattia di Lyme nel cavallo comprendono febbre, rigidità e zoppia in più di un arto, debolezza muscolare, iperestesia e cambiamenti caratteriali (Burgess e coll., 1986; Burgess e Mattison, 1987; Magnarelli e coll., 1988; Browning e coll., 1993; Hahn e coll., 1996). Diversamente dall'uomo, i versamenti articolari sono minimi nei cavalli. Perdita di muscolatura e dolore nella zona toracolombare sono stati riscontrati in alcuni cavalli con titolo anticorpale elevato. Risulta segnalato un cavallo che ha manifestato atassia e grave infiltrazione linfocitaria delle meningi (Divers, 2007). C'è una segnalazione di disfunzioni neurologiche in un cavallo attribuito alla Lyme (Hahn e coll., 1996) e in un pony è stata riportata una panuveite (Burgess e coll., 1986). La febbre alta e l'edema distale, riportati in associazione a siero conversione verso *Borrelia*, sono spesso il risultato di una infezione concomitante da *A. phagocytophilum* (Chang e coll., 2000a).

Infezioni sperimentali nei pony hanno provocato lesioni cutanee, muscolari, sui nervi e nel tessuto perisinoviale, ma non sono stati osservati segni clinici. La patologia è stata moderata in molti dei pony. Finché la malattia non viene riprodotta sperimentalmente la sintomatologia clinica associata ad infezione da *Borrelia* rimarrà poco chiara. È possibile che alcuni cavalli, probabilmente associati al complesso maggiore di istocompatibilità e reazioni antigene-anticorpo, possano essere predisposti a manifestare segni clinici in seguito all'infezione (Divers, 2007).

## 4.7 LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE

### 4.7.1 UOMO

Le informazioni riguardanti le lesioni anatomopatologiche sono scarse, in quanto questa malattia difficilmente provoca la morte dei pazienti.

Da prelievi istologici a livello di eritema migrante, linfocitoma cutaneo o acrodermatite possono essere isolati le spirochete (Zanconati e coll., 1994; Hödl e coll., 1996; Chodyncka e coll., 2009).

L'eritema migrante istologicamente presenta uno strato corneo assottigliato, atrofia dell'epidermide con piccoli foci spongiosi, perdita di ghiandole sebacee e infiltrazione perivascolare sia superficiale che profonda di linfociti, plasmacellule e istiociti (Weger e Müllegger, 2001).

Nei tessuti prelevati dal linfocitoma si evidenzia una densa infiltrazione di linfociti maturi attraverso il derma, con o senza la formazione di strutture follicolari nello strato reticolare che ricordano i centri germinativi dei linfonodi (Weger e Müllegger, 2001). Diversamente dai linfomi, i noduli presenti nel linfocitoma sono costituiti da cellule T e B contemporaneamente.

Le biopsie effettuate a livello di ACA mostrano un derma sclerotico infiltrato di cellule mononucleari, che talvolta si estendono a grasso sottocutaneo (Weger e Müllegger, 2001). Linfociti e plasmacellule talvolta convergono attorno agli annessi cutanei, ai vasi dilatati e alle fibre collagene. I fasci connettivali possono presentarsi rigonfi per il deposito di mucina. Può essere presente anche infiltrazione linfocitica a livello neurale. Nelle fasi tardive dell'acrodermatite si può assistere ad una perdita delle fibre collagene ed elastiche (Bhate e Schwartz 2011b).

A livello perivascolare e perineurale si possono riscontrare infiammazioni caratterizzate da infiltrazione da cellule mononucleate (Avanzi e coll., 1998). Infiltrazioni di questo tipo possono essere presenti anche a livello di piccole arterie adiacenti il perinervio di molti nervi periferici e della muscolatura scheletrica.

### 4.7.2 ANIMALI

**Cane-gatto:** in cani infettati sperimentalmente sono state ottenute lesioni istologiche in diverse localizzazioni: linfonodi, articolazioni, pericardio e cute (Appel e coll., 1993). In aggiunta sono state riscontrate infiammazioni a livello vascolare (vasculiti, arteriti), nervoso (perineuriti) e delle meningi (meningiti). Istologicamente si rilevano, a livello dei linfonodi, espansioni follicolari e aumento delle aree parafollicolari. Le biopsie cutanee presentano infiltrazioni linfoplasmocitarie a livello perivascolare con accumulo di mast cellule.

In questi cani non erano state rilevate lesioni renali, riscontrate invece in cani che si erano infettati naturalmente (Dambach e coll., 1997). In questi ultimi era stata osservata la presenza di glomerulo nefriti, necrosi tubulari diffuse con rigenerazione e infiammazione interstiziale. La presenza delle borrelie, evidenziata attraverso l'impregnazione argentea, si è rivelata scarsa a livello di lesioni renali.



Nei gatti infettati sperimentalmente è stata invece riscontrata degenerazione epatica, iperplasia splenica, plasmocitosi nei linfonodi regionali, meningoencefalite non purulenta, polmoniti e lesioni renali simili a quelle evidenziate nei cani (Gibson e coll., 1995).

**Cavallo:** nei cavalli infettati sperimentalmente le lesioni sono per lo più limitate a reazioni linfo-istiocitiche della pelle, che circondano il sito di inoculo, e iperplasia linfoide dei linfonodi regionali (Chang e coll., 1999; 2000). Un pony infettato sperimentalmente presentava una infiammazione mononucleare nei muscoli cutanei e nel pannicolo, specialmente attorno alle piccole arterie e ai nervi. Si possono formare aggregati mononucleari perivascolari anche attorno alle piccole arterie adiacenti al perinervio dei nervi periferici, quali ad esempio l'ulnare, il facciale, lo sciatico, il labiale o attorno alle radici dei nervi spinali. Questo tipo di infiltrazioni sono state riscontrate anche a livello di muscolatura scheletrica in diverse aree (Chang e coll., 1999). Nel pony infettato sperimentalmente le lesioni si manifestavano con maggiore gravità nel lato in cui si era attaccata la zecca (Chang e coll., 1999).

## 4.8 DIAGNOSI

La malattia di Lyme presenta sintomi clinici simili ad altre malattie da zecca quali anaplasmosi, babesiosi, STARI (*Southern tick-associated rash illness*) causata sempre da spirochete (*Borrelia lonestari*); inoltre la diffusione epidemiologica spesso si sovrappone (Bhate e Schwartz, 2011b). Altre diagnosi differenziali, soprattutto riguardo l'eritema migrante, possono comprendere reazioni di ipersensibilità alle punture di insetti, erisipela, celluliti, sclerodermi localizzati, granulomi anulari, tigna, orticaria, ecc. (Müllegger, 2004; Tibbles e Edlow, 2007). Molte di queste malattie possono spesso essere escluse se il paziente riporta un morso di zecca e un lesione cutanea eritematosa, anulare e che tende ad allargarsi. Le reazioni di ipersensibilità da punture di insetto in genere si manifestano entro 24-48 ore e regrediscono spontaneamente (Müllegger, 2004). Le infezioni batteriche cutanee si differenziano in genere per la presenza di leucitosi neutrofiliche (Tibbles e Edlow, 2007). La tigna determina la formazione di lesioni con bordi eritematosi e centro chiaro, che però sono meno demarcate ed espandono in maniera più lenta, inoltre hanno un bordo forforoso che non si riscontra nell'eritema migrante (Dandache e Nadelman, 2008).

Se i sintomi cutanei si presentano chiari, la diagnosi di LD può essere fatta clinicamente. La possibile esposizione alle zecche è un altro dato che avvalora l'ipotesi diagnostica, oltre alla presenza di altri sintomi cardiaci, neurologici o reumatologici (Bhate e Schwartz, 2011b).

Tuttavia la diagnosi può essere confermata attraverso diverse metodiche analitiche, impiegabili sia in campo umano che animale.

### 4.8.1 SIEROLOGIA

L'assenza di marker sierici nelle prime fasi della malattia può porre dei limiti alla

diagnosi della malattia. Il CDC e la Società Tedesca per l'Igiene e la Microbiologia (DGHM) hanno istituito le linee guida per la diagnosi sierologica (Brouqui e coll., 2004; Wilske e coll., 2007). Si dovrebbe procedere con uno screening iniziale utilizzando sia ELISA che IFAT. Risultati dubbi o positivi dovrebbero essere seguiti dal Western Blot (Oldak e coll., 2008).

ELISA e IFAT rilevano la presenza di IgM e IgG per *B. burgdorferi* (Magnarelli, 1988). Le IgM si rilevano 2-6 settimane dopo l'esposizione e calano rapidamente. Questi anticorpi possono essere presenti per molto tempo nel caso di malattia prolungata o di reinfezioni, ma possono anche essere riscontrati in pazienti precedentemente trattati (Kalish e coll., 2001). Dopo 3 o 4 settimane dall'infezione si alza il livello di IgG e si stabilizza, creando uno "scoglio immunologico" che indica l'esposizione al patogeno ma non necessariamente la malattia (Kalish e coll., 2001). Una risposta negativa alla ricerca delle IgG può indicare una forma di borreliosi tardiva.

L'IFAT può permettere la quantificazione del titolo anticorpale, anche se il risultato può essere variabile in funzione dell'operatore (Bunikis e Barbour, 2002). L'ELISA è un test iniziale più sensibile (Lencakova e coll., 2008), i kit commerciali rilevano in generale gli anticorpi verso l'intera cellula batterica. Strumenti più recenti possono utilizzare antigeni di superficie o antigeni ricombinanti come VlsE o C<sub>6</sub>, riconosciuti come ampiamente conservati nelle varianti patogene (Aguero-Rosenfeld e coll., 2005; Marangoni e coll., 2008).

I risultati dei test ELISA possono essere positivo, negativo o indeterminato, basandosi sull'assorbanza del complesso antigene-anticorpo-anti-anticorpo nei confronti del controllo negativo. Sebbene la sensibilità sia maggiore, solo il 20-30% dei pazienti presenta sieroreattività nelle prime due settimane e il 70-80% durante la convalescenza (Steere, 2001).

Il Western Blot è più sensibile e specifico dell'ELISA nella ricerca degli anticorpi anti-borrelia (Dressler e coll., 1993). Viene utilizzato come seconda scelta nella diagnosi a causa dei costi e della carenza di standardizzazione nell'interpretazione dei risultati (Bakken e coll., 1992). Fortunatamente, studi recenti hanno permesso di rendere più confrontabili sia i processi manuali che quelli automatizzati (Binnicker e coll., 2008). In Europa il WB deve essere utilizzato e interpretato correttamente a causa della eterogeneità delle infezioni da *Borrelia* spp. Gli antigeni utilizzati nel WB sono stati definiti in base al peso in kDa. In USA vengono utilizzati per le IgM le seguenti bande antigeniche: FlaB (41 kDa); BmpA (39 kDa) e OspC (24 kDa) (Engstrom e coll., 1995). Il WB per le IgG utilizza 10 antigeni. 5 per FlaB (93-, 66-, 58-, 45-, 41-kDa), uno per BmpA (39 kDa), 3 per OspC (30-, 28, 21-kDa) e uno per proteine da 18 kDa (Dressler e coll., 1993). I criteri fissati dal CDC impongono la presenza di almeno due delle tre bande per la positività delle IgM e 5 su 10 per le IgG (CDC, 1995). In Europa la scelta degli antigeni è relativa alla manifestazione clinica e al presunto stadio della malattia. L'immunoblot per le IgM può risultare positivo una settimana dopo il morso della zecca e rimanere tale per 6-8 settimane (Bhate e Schwartz, 2011b).

La scarsa sensibilità dei test sierologici convenzionali può essere correlato alla formazione di complessi antigene-anticorpo, non individuabili con queste metodiche (Schutzer e coll., 1999). La formazione di immunocomplessi è stata riscontrata in topi, scimmie e conigli (Schutzer e Luan, 2003), accendendo l'attenzione verso studi su modelli animali. I complessi di OspA, OspB e OspC si formano nelle fasi iniziali, anche prima della siero conversione, e possono essere precipitati utilizzando

preparazioni a base di glicole polietilenico (Schutzer e coll., 1999). Schutzer e coll. (1994) hanno dimostrato la presenza di immunocomplessi sia con l'intera spirocheta che con la proteina OspA nel siero di 20 su 21 pazienti con EM, originari di una zona endemica. Contemporaneamente, IgM libere sono state riscontrate solo nella metà dei pazienti. Il potenziale dell'utilizzo degli immunocomplessi è stato dimostrato in una donna gravida con un sospetto di malattia di Lyme. Le borrelie non erano state ritrovate all'esame istologico, tuttavia i campioni di siero presentavano gli immunocomplessi (Bhate e Schwartz, 2011b).

Gli anticorpi anti-borrelia possono essere ritrovati anche nel liquido cefalo-rachidiano di pazienti con neuroborreliosi, soprattutto in Europa (Hansen e Lebech, 1991) utilizzando ELISA e Western Blot. Gli anticorpi IgM e IgG possono essere evidenziati utilizzando cellule intere o proteine ricombinanti come ad esempio DbpA, BBK32, OspC e flagellina (Aguero-Rosenfeld e coll., 2005).

Molti kit ELISA diagnostici non presentano una composizione antigenica standardizzata. Questo fattore è rilevante soprattutto in Europa, dove è presente una eterogenicità delle specie di *Borrelia* patogene (Wilske e coll., 2007). Il risultato che ne deriva è una risposta anticorpale meno solida, determinando una minore sensibilità e specificità dei test ELISA. Altro fattore critico è la condivisione, da parte di *Borrelia* spp., di molti antigeni con altri batteri quali *Treponema pallidum* o spirochete saprofite della normale flora batterica umana (Bruckbauer e coll., 1992). Di conseguenza risultati positive all'ELISA o al WB possono non essere indicativi di Lyme; al contrario risultati negativi possono in realtà essere falsi negativi. La presenza di IgM senza però il conseguente rinvenimento di IgG può essere indicativo di falsa positività (Bhate e Schwartz, 2011b).

ELISA, IFAT e Western Blot vengono impiegati anche nella diagnosi nel cane. Il WB aiuta nell'identificazione di falsi positivi e permette di differenziare gli animali vaccinati da quelli naturalmente infetti. Il pattern di risposta anticorpale dopo un'infezione naturale è diverso da quello indotto dalla vaccinazione (Greene e Sraubinger, 2006).

È inoltre presente un kit commerciale IDEXX che rileva la presenza di anticorpi verso il peptide C<sub>6</sub>. Questo test permette di differenziare gli animali vaccinati da quelli infetti con un'accuratezza maggiore rispetto al WB. La risposta anti C<sub>6</sub> aumenta molto più velocemente rispetto agli anticorpi identificati dal test ELISA utilizzando antigeni estratti dall'intero spirochete (Philipp e coll., 2001). Il C<sub>6</sub> non reagisce nei sieri di cani sani, in quelli con infezioni diverse da *B. burgdorferi* o in quelli vaccinati sia utilizzando la lipoproteina OspA o l'intero batterio (Liang e coll., 2000; O'Conner e coll., 2004).

L'utilizzo di questo peptide come antigene nei test diagnostici può aiutare nel determinare infezioni attive o valutare l'efficacia del trattamento (Greene e Sraubinger, 2006).

Il C<sub>6</sub> è stato valutato anche nei gatti, però su un numero limitato di casi (Levy e coll., 2003). Su 24 gatti testati in una regione endemica, 17 hanno mostrato un risultato positivo, in accordo con il test IFAT. I gatti erano stati scelti per la possibile esposizione e non per manifestazioni cliniche. Come nel cane, anche nel gatto il C<sub>6</sub> può aiutare la diagnosi in soggetti che presentano sintomatologia (febbre e gonfiore articolare) (Greene e Sraubinger, 2006).

Anche nel cane viene analizzato il LCR per la ricerca degli anticorpi. Un aumento intratecale della concentrazione anticorpale è stato evidenziato in cani con

disfunzioni neurologiche (Mandel e coll., 1993).

Anche per il cavallo i test ELISA e IFAT sono quelli più utilizzati per la diagnosi della malattia di Lyme. La valutazione del C6 utilizzando il kit IDEXX ha mostrato buone correlazioni con l'ELISA per il cavallo. Come per il cane, il Western Blot viene utilizzato nel cavallo per differenziare gli animali infetti da quelli vaccinati (Divers, 2007).

#### 4.8.2 BIOLOGIA MOLECOLARE

La PCR è la tecnica molecolare più utilizzata per la diagnosi di malattia di Lyme. Questa tecnica è più attendibile della sierologia e della coltura nella diagnosi precoce dell'infezione (Schmidt, 1997).

La prima PCR specifica per *B. burgdorferi* s.l. è stata messa a punto nel 1989 (Rosa e Schwan, 1989). I campioni biologici analizzabili alla PCR sono biopsie cutanee di pazienti con EM o ACA (Whang, 2002), sangue, LCR o liquido sinoviale.

La sensibilità dell'analisi può diminuire in seguito a degradazione del DNA dei batteri durante il trasporto, la conservazione e lo stoccaggio. Dai campioni di cute mantenuti in terreno di trasporto come il BSK, le borrelie possono fuoriuscire e localizzarsi nel medium. In questo caso è opportuno eseguire l'estrazione del DNA anche dal terreno (Aguero-Rosenfeld e coll., 2005).

Tecniche di tipo qualitativo sono in genere adeguate, ma sono disponibili anche protocolli di tipo quantitativo (Bhate e Schwartz, 2011b).

L'analisi qualitativa si basa sulla ricerca di specifici geni: FlaB, RecA, p66 e OspA, oltre ad alcuni geni ribosomiali (Schmidt, 1997). La specificità descritta sui vari tipi di campioni si avvicina al 100% (Aguero-Rosenfeld e coll., 2005). La sensibilità può essere scarsa, in funzione della natura variabile dei batteri nel tempo e delle diverse varianti (Schmidt, 1997). I primer ideali dovrebbero essere molto specifici per *B. burgdorferi* s.l. ma universali per le genospecie che causano la Lyme (Schmidt, 1997). La sensibilità dipende anche dal tipo di campione, infatti nel sangue e nel LCR tende ad essere inferiore (Aguero-Rosenfeld e coll., 2005).

I protocolli di PCR in molti casi non sono standardizzati e può risultarne una notevole variabilità tra i laboratori che effettuano le analisi (Lange e Seyyedi, 2002).

Un protocollo di real-time PCR per la quantificazione del DNA di *B. burgdorferi* è stato utilizzato per la prima volta su topi infettati sperimentalmente (Morrison e coll., 1999). Successivamente questa tecnica è stata utilizzata per genotipizzare le specie patogene di *B. burgdorferi* s.l. sia nelle zecche che nei pazienti con eritema migrante in Europa (Pietila e coll., 2000; Mommert e coll., 2001; Rauter e coll., 2002). È stato messo a punto anche un protocollo di multiplex real-time PCR che permette il rilevamento di *B. burgdorferi* e *A. phagocytophilum* contemporaneamente (Courtney e Massung, 2003).

La PCR è una tecnica che permette di confermare i sospetti diagnostici di LB permette di identificare o tipizzare la specie coinvolta nell'infezione e permette di individuare infezioni. Tuttavia la PCR non viene accettata ovunque nei laboratori diagnostici per la scarsa sensibilità ottenuta dai campioni di sangue e liquor. La PCR è molto sensibile sui campioni cutanei di EM (Dumler., 2001), ma se queste lesioni sono molto caratteristiche, la diagnosi viene effettuata anche senza la biologia molecolare. In pazienti in cui c'è un coinvolgimento sistemico, la sensibilità

del test diminuisce molto, ad eccezione per la forma artritica (Aguero-Rosenfeld e coll., 2005).

Le tecniche di biologia molecolare possono essere impiegate con successo anche nel cane, anche se le analisi sierologiche sono generalmente quelle più impiegate (Little e coll., 2010).

#### 4.8.3 ISOLAMENTO COLTURALE

La coltivazione dell'agente eziologico è la tecnica più specifica per la diagnosi di malattia di Lyme (Aguero-Rosenfeld e coll., 2005). I terreni utilizzati sono dei terreni liquidi modificati dal terreno impiegato inizialmente, il medium "Kelly" (Kelly, 1971), e sono ad esempio: il BSK II (Barbour-Stoener-Kelly II) (Barbour, 1984), il BSK-H (Pollack e coll., 1993) e MKP (Medium Kelly-Preac-Mursic) (Preac-Mursic e coll., 1986). Le colture sono in genere incubate a 30-34°C in condizioni di microaerofilia. Temperature di 39°C o superiori possono rallentare o inibire la crescita (Barbour, 1984). La coltura dura circa 12 settimane, un tempo molto più lungo rispetto ad altri batteri patogeni, a causa del tempo di generazione prolungato (7-20 ore) durante la fase logaritmica (Barbour, 1984). Il monitoraggio della coltura viene effettuato osservando il surnatante con il microscopio a campo oscuro o con quello a fluorescenza (Reed, 2002).

*B. burgdorferi* può crescere anche su terreni solidi, utilizzando gli stessi terreni decritti in precedenza addizionati di agar in condizioni di microaerofilia o anaerobiosi (Barbour, 1984).

Ceppi batterici coltivati in laboratorio possono essere co-cultivati anche su linee cellulari di zecca (Kurtti e coll., 1988; Obonyo e coll., 1999) e su linee cellulari di alcuni mammiferi (Hechemy e coll., 1992; Speck e coll., 2002).

*B. burgdorferi* s.l. può essere isolato da diversi tessuti e fluidi biologici di pazienti affetti da LB: biopsie (Strle e coll., 1996) o lavaggi di lesioni da EM (Wormser e coll., 1992), biopsie da lesioni acrodermatose (Picken e coll., 1998), biopsie da linfocitomi (Maraspin e coll., 2002), campioni di liquidi cerebro-spinali (Karlsson e coll., 1990), e sangue (Wormser e coll., 2000a). È stato segnalato anche l'isolamento del batterio dal liquido sinoviale (Schmidli e coll., 1988), tessuto cardiaco (Stanek e coll., 1990) e iride (Preac-Mursic e coll., 1993).

### 4.9 **TERAPIA**

#### 4.9.1 TERAPIA NELL'UOMO

##### 4.9.1.1 Terapia preventiva

Un approccio di tipo preventivo dopo il morso di una zecca viene proposto in America utilizzando una singola iniezione di doxyciclina (Wormser e coll., 2007). In Europa un trattamento analogo non è stato valutato (Girschick e coll., 2009).

#### 4.9.1.2 Terapia delle manifestazioni iniziali

L'eritema migrante in genere regredisce spontaneamente entro 6 settimane, ma una terapia antibiotica può accorciarne la durata a pochi giorni (Steere coll., 1980). Trattamenti con doxyciclina (4 mg/kg/giorno in due somministrazioni), amoxycillina (50 mg/kg/giorno in 3 dosi) o cefuroxime acetile (20-30 mg/kg/giorno in due dosi) tutti per 14 giorni si sono dimostrati efficaci (Wormser, 2006). Nel caso invece del linfocitoma cutaneo la terapia va protratta per 28 giorni (Girschick e coll., 2009). Considerati i problemi di allergia correlati alle penicilline e il fatto che la doxyciclina non può essere impiegata nei bambini, l'azitromicina è stata ampiamente valutata per il trattamento dell'EM. Alcuni autori però sostengono che l'efficacia di questo principio attivo sia inferiore a quella dell'amoxycillina (Luft e coll., 1996). Nei pazienti che presentano anche forme disseminate con sintomi di febbre, mialgia, artralgia, mal di testa e linfadenopatia la somministrazione di doxyciclina per 21 giorni o di ceftriaxone per 14 giorni sono ugualmente efficaci nella prevenzione della sintomatologia tardiva (Dattwyler e coll., 1997). Amoxycillina e doxyciclina possono essere impiegate anche nel trattamento delle forme cardiache, oculari e articolari (Girschick e coll., 2009).

Nella seconda fase della malattia, quando insorgono i sintomi nervosi, gli antibiotici utilizzabili sono penicillina (0,5 milioni U/kg/giorno divise in 6 dosi), ceftriaxone (50 mg/kg/giorno in 3 dosi) e cefotaxime (200 mg/kg/giorno in dose singola) per via endovenosa per 14 giorni, oppure doxyciclina per via orale (4 mg/kg/giorni in due dosi) sempre per 14 giorni (Girschick e coll., 2009).

#### 4.9.1.3 Terapia delle manifestazioni tardive

**Artriti:** L'infiammazione sinoviale può persistere anche se l'infezione è stata eliminata dall'uso di antibiotici (Kannian e coll., 2007). L'artrite può risolversi anche dopo periodi di 6 anni o più sia negli adulti che nei bambini (Steere e Angelis, 2006), in funzione probabilmente di fattori immunologici, genetici o correlati al patogeno (Girschick e coll., 2009). Alcuni autori hanno proposto terapie antibiotiche ripetute con doxyciclina o amoxycillina nel caso di artriti lievi, o con ceftriaxone, cefotaxime o penicillina nel caso di artriti più gravi (Steere e Angelis, 2006). Girschick e coll. (2009) propongono invece l'utilizzo del solo cefotaxime per 14 giorni. Per i bambini di età superiore a 8 anni può essere utilizzata la doxyciclina.

Accanto agli antibiotici sono consigliate anche terapie con FANS, per contribuire alla risoluzione dell'infiammazione più velocemente (Girschick e coll., 2009).

**Forme neurologiche:** trattamenti antibiotici sono consigliati anche in corso di complicazioni neurologiche utilizzando nuovamente cefotaxime e penicillina.

**ACA:** il trattamento dell'acrodermatite cronica prevede l'impiego di cefotaxime per almeno 4 settimane.

#### 4.9.2 TERAPIA NEGLI ANIMALI

**Cane-gatto:** il trattamento immediato nella terapia della malattia di Lyme prevede la riduzione del titolo anticorpale e il numero di batteri nell'organismo, oltre alla prevenzione o la cura di zoppie e problemi articolari (Straubinger e coll., 1998).

Gli antibiotici, utilizzati per almeno 30 giorni, sono amoxycillina, azytromicina,

ceftriaxone e doxyciclina. A causa di una difficoltà di ripulire gli animali dall'infezione, si può registrare la presenza dei batteri a livello articolare. Questa persistenza provoca processi infiammatori cronici. I soggetti con forme di borreliosi cronica sono meno propensi a migliorare e più facilmente manifestano recidive, anche se trattati per settimane o mesi.

La doxyciclina è in genere la terapia di elezione alla dose di 10 mg/kg bid. Negli animali in crescita si preferisce usare l'amoxicillina, per evitare il deposito delle tetraciline nei denti o nelle unghie (Greene e Sraubinger, 2006). Il ceftriaxone è in genere utilizzato nell'uomo, quindi si cerca di evitarne l'uso negli animali. L'amoxicillina viene impiegata alla dose di 20 mg/kg ogni 8 ore; l'azytromicina invece può essere somministrata alla dose di 25 mg/kg una volta al giorno (Greene e Sraubinger, 2006).

Per alleviare i sintomi articolari, si può affiancare una terapia antidolorifica, prestando però attenzione alle possibili complicazioni gastro-enteriche. I glucocorticoidi potrebbero essere utilizzati, in quanto anche a bassi dosaggi sono efficaci nel trattamento delle artriti croniche. Tuttavia questi farmaci hanno effetto immunosoppressore; alla dose di 2mg/kg/giorno per 2 settimane possono far riattivare infezioni latenti (Straubinger e coll., 2000). I cani trattati non manifestano segni di zoppia, ma quando la terapia viene sospesa possono sviluppare artrite entro una settimana (Straubinger e coll., 2000).

Il trattamento delle disfunzioni renali varia a seconda dello stadio e della gravità della malattia. Una marcata proteinuria può provocare sindrome nefrosica e ipertensione sistemica. In questo stadio iniziale si possono utilizzare ACE inibitori e farmaci antiinfiammatori. Al progredire della malattia, si può manifestare ipoproteinemia e diminuzione della perfusione renale che necessitano di agenti vasoattivi e diuretici osmotici. Purtroppo il danno renale è progressivo, nonostante la terapia (Greene e Sraubinger, 2006).

**Cavallo:** i farmaci utilizzati normalmente nel cavallo sono tetraciclina per via endovenosa o doxyciclina per via orale. La tetraciclina manifesta una maggiore concentrazione tissutale rispetto alla doxyciclina (Bryant e coll., 2000). La dose esatta e la durata della terapia non sono chiare. In generale si consiglia un dosaggio di 6,6 mg/kg di tetraciclina ogni 24 ore per 7-10 giorni, seguita da una terapia con doxyciclina a 10 mg/kg bid per almeno 1 mese. Per considerare il trattamento efficace, si effettua un monitoraggio del titolo anticorpale, che deve essere inferiore a 110 unità ELISA dopo la sospensione della terapia, e continuare a calare nel tempo (Divers, 2007).

#### 4.10 PROFILASSI

Come già visto in precedenza per le altre malattie trattate, la profilassi di tipo diretto consigliata per l'uomo nei confronti della malattia di Lyme prevede di evitare le zone a rischio di infezione o comunque di prestare attenzione nelle aree ad alta densità di zecche (Schutzer e coll., 1997a). Nel caso si frequentino queste aree o si sospetti una possibile esposizione ai vettori, è consigliato, come per le altre malattie, utilizzare metodi di protezione personale, come i repellenti acaricidi e l'abbigliamento adeguato a ostacolare l'attacco delle zecche (Hayes e Piesman, 2003). L'ispezione accurata del corpo dopo aver frequentato aree a rischio è fondamentale, soprattutto

per individuare e rimuovere le zecche in tempi brevi, anche se alcuni lavori mettono in dubbio l'efficacia di una rimozione tempestiva delle stesse (Vazquez e coll., 2008).

Per quanto concerne l'ambiente, l'uso di acaricidi è di solito sconsigliato, per i problemi di contaminazione (Piesman, 2006). La rimozione e bruciatura delle foglie secche può avere gli stessi effetti degli acaricidi (Stafford e coll., 1998).

Alcuni studiosi hanno anche proposto la rimozione dei cervidi da determinate aree per controllare il numero delle zecche (Stafford e coll., 2003; Rand e coll., 2004; Piesman, 2006), il rapporto però tra la rimozione degli ospiti e il numero delle zecche non è ben chiaro e comunque è una tecnica difficilmente attuabile su larga scala (Bhate e Schwartz, 2011b).

La chemioprolissi con doxyciclina è una pratica molto utilizzata negli Stati Uniti, soprattutto nelle aree endemiche per la malattia di Lyme, in cui il tasso di infezione nelle zecche raggiunge il 20% (Bhate e Schwartz, 2011b). L'antibiotico viene somministrato a pazienti che denunciano una puntura da *I. scapularis*, con un pasto di sangue di almeno 36 ore ed entro 72 ore dalla rimozione (Wormser e coll., 2006). In Europa questo tipo di approccio non viene attuato (Stanek e Strle, 2003).

La vaccinazione nelle aree endemiche potrebbe essere uno strumento valido nel controllo della malattia (Meurice e coll., 1997). In USA vaccini contenenti OspA ricombinanti (LYMERix) erano stati approvati nel 1998 (Rutter, 1998). Questi vaccini determinano la formazione di anticorpi anti-Borrelia che vengono assunti dalla zecca durante il pasto e attaccano le spirochete nel suo intestino, bloccando il ciclo (Bhate e Schwartz, 2011b). L'impiego di questo metodo di profilassi non ha però riscosso un grande successo, in quanto viene considerato più che altro un metodo di precauzione ambientale (Rutter, 1998), inoltre i soggetti vaccinati non sono distinguibili da quelli infettati naturalmente (Schutzer e coll., 1997c). I costi di produzione e gli effetti collaterali provocati dal vaccino hanno spinto i produttori a sospenderne la commercializzazione nel 2002 (Bhate e Schwartz, 2011b).

Sono stati fatti studi su altri antigeni da impiegare nell'allestimento dei vaccini, come ad esempio OspC (Earnhart e Marconi, 2007), ma il fallimento del LYMERix ha dissuaso molti ricercatori (Bhate e Schwartz, 2011b).

Per quanto riguarda il cane, oltre ai metodi di controllo delle infestazioni da zecche visti in precedenza, la profilassi di tipo indiretto attraverso la vaccinazione sembra proteggere dalla malattia di Lyme in America (Keller e coll., 1994). In Europa, data la molteplicità delle specie patogene, la protezione risulta meno efficace. I vaccini disponibili in America contengono la proteina OspA o cellule batteriche inattivate (Greene e Straubinger, 2006). Lo schema vaccinale consigliato prevede di effettuare un primo trattamento a 4 settimane per i vaccini con OspA e a 12 settimane per quelli con antigene intero. In entrambi i casi viene ripetuto un richiamo dopo 3-4 settimane. La vaccinazione è in genere consigliata per cani che frequentano abitualmente aree a rischio o che vivono in aree endemiche (Greene e Straubinger, 2006).

L'immunità prodotta dopo la vaccinazione permette al cane di avere una protezione principalmente contro gli antigeni OspA (Rice Conlon e coll., 2000; Straubinger e coll., 2002). Questo tipo di protezione non viene riscontrata in cani che si infettano naturalmente. La proteina OspA è espressa da *Borrelia* nell'intestino della zecca prima del pasto di sangue e permette al batterio di colonizzarla. Durante il pasto di sangue, con l'intervento del sistema complemento, gli anticorpi verso OspA



inibiscono l'invasione delle ghiandole salivari, da parte del batterio, in zecche che si alimentano su cani vaccinati (De Silva e coll., 1997).

I vaccini disponibili non determinano una protezione duratura e nei cani a rischio è raccomandato il richiamo annuale (Greene e Straubinger, 2006).

Uno svantaggio della vaccinazione potrebbe essere quello di non distinguere animali vaccinati da animali naturalmente infetti, questo problema viene però superato dall'impiego di metodiche di immunoblotting ed kit specifici per il C<sub>6</sub>, argomento già affrontato in precedenza (Greene e Straubinger, 2006). Un altro problema potrebbe essere l'insorgere di reazioni di ipersensibilità, soprattutto utilizzando vaccini ad antigene intero (Jacobson e coll., 1996). I cani, prima di essere sottoposti a vaccinazione, dovrebbero essere accuratamente visitati per escludere infezioni latenti; inoltre i cani con precedenti esposizioni alla Lyme non dovrebbero essere vaccinati (Greene e Straubinger, 2006).

La prevenzione della malattia di Lyme nel cavallo prevede, come per gli altri animali e l'uomo, l'utilizzo di prodotti repellenti e la rimozione tempestiva delle zecche. Possono essere impiegati anche trattamenti antibiotici profilattici a seguito di morso di zecca o vaccini (Divers, 2007).

Per quanto riguarda i vaccini, prove sperimentali condotte su pony utilizzando l'antigene OspA hanno evidenziato una buona protezione dopo l'attacco di zecche infette 92 giorni dopo la terza vaccinazione (Chang e coll., 1999). Attualmente non sono registrati vaccini per il cavallo, quindi la durata della protezione, gli effetti collaterali e l'efficacia dei vaccini per cani, utilizzati sul cavallo, è tuttora sconosciuta (Divers, 2007).

# 5

## MATERIALI E METODI

## 5.1 CAMPIONAMENTO DELLE ZECCHÉ

Sono stati effettuati campionamenti di zecche ixodidae dall'ambiente (*questing ticks*) in quattro aree delle province di Bologna e Ravenna.

I campionamenti sono stati effettuati ogni 15 giorni a partire da aprile fino a ottobre 2010, sempre negli stessi siti di campionamento. La tempistica di raccolta poteva variare di un giorno rispetto al programma stabilito in relazione alle condizioni atmosferiche, in quanto non poteva essere effettuata in caso di pioggia (Sonenshine, 1993). Oltre a questi campionamenti a livello ambientale, sono state raccolte zecche ixodidae che stavano compiendo il pasto di sangue (*feeding ticks*) su animali o su persone nelle zone dello studio ambientale.

### 5.1.1 QUESTING TICKS

La raccolta delle zecche dal suolo e dalla vegetazione è stata effettuata utilizzando teli di stoffa di 100 cm x 100 cm, che venivano trascinati "spazzolando" le aree da campionare; questo metodo è definito dalla letteratura anglosassone con il nome di *flagging* (Sonenshine, 1993).

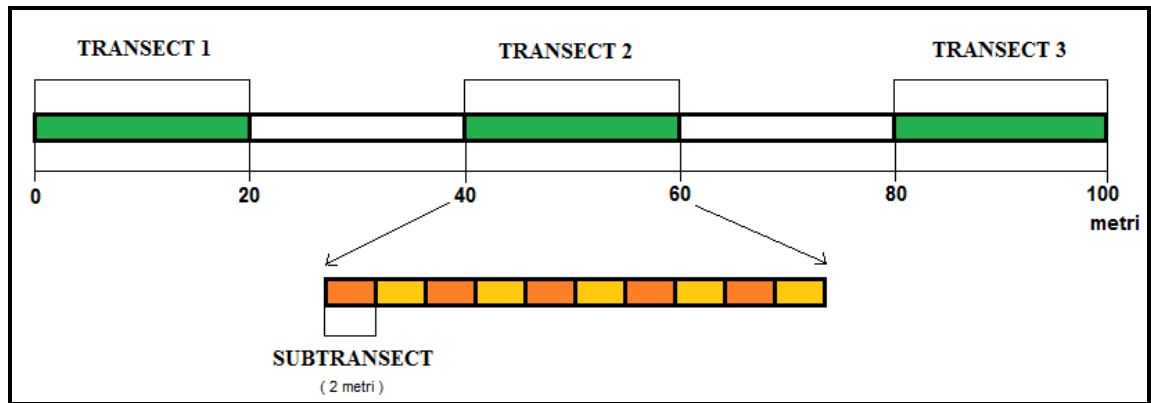
I teli, di colore bianco per permettere una più semplice visualizzazione delle zecche attaccate, sono montati su di un bastone in modo da mantenerli ben tirati durante lo strascico sul terreno.

Il telo (Fig. 5.1) viene tirato lentamente per permettere l'attacco delle zecche, attratte dal movimento del telo stesso. Ogni 2 metri di percorso, secondo le indicazioni di Li e Dunley (1998), il telo viene accuratamente ispezionato, per individuare e prelevare le zecche che si sono attaccate, facendo particolare attenzione alle larve, che essendo di piccole dimensioni possono sfuggire all'osservazione, soprattutto se il telo è sporco o ha raccolto frammenti di vegetazione e terriccio.

Nel nostro studio abbiamo campionato sia lungo percorsi lineari che intere aree. Per quanto riguarda le zone campionate come percorsi lineari sono stati definiti tratti di 100 metri suddivisi in "fasce" da 20 metri ciascuna; il campionamento è stato effettuato per trascinamento del telo sulla prima, terza e quinta fascia da 20 metri che abbiamo chiamato TRANSECT 1, TRANSECT 2 e TRANSECT 3 (Schema 5.1). In ogni *transect* il controllo dei teli è stato effettuato ogni 2 metri definiti *subtransects* (Li e Dunley, 1998). Lungo i percorsi lineari, essenzialmente sentieri, è stato campionato il lato a monte, in quanto considerato più ricco di zecche (Kramer and Beesley, 1993).



Figura 5.1 – Strisciamento del telo di stoffa sull'area di campionamento



Schema 5.1: Rappresentazione schematica del percorso campionato suddiviso in *transect* e *subtransect*

Per quanto riguarda le zone campionate come aree, il campionamento è stato effettuato strisciando il telo su tutta la superficie. Ogni 2 metri, come per il campionamento lineare, i teli sono stati controllati e le zecche attaccate sono state prelevate, in modo tale da limitarne il fenomeno del distacco dal telo (Li e Dunley, 1998).

Durante ogni campionamento e per ciascun transect sono state registrate la temperatura in gradi centigradi e l'umidità percentuale di ogni sito a 5 cm dal suolo (Schwarz e coll., 2009) utilizzando un termometro con igrometro (Oregon Scientific) in modo tale da avere informazioni microclimatiche specifiche di ogni luogo di raccolta.

### 5.1.2 ZONE DI CAMPIONAMENTO

Le aree scelte per il campionamento (Fig. 5.2) sono rappresentate da sentieri, aree picnic e aree boschive nei pressi dei sentieri in parchi naturalistici dell'Emilia Romagna.

Le aree prese in esame sono localizzate lungo la dorsale appenninica e sebbene distanziate anche di alcune centinaia di chilometri, presentano caratteristiche ambientali e geologiche simili.

In provincia di Bologna le aree campionate sono state:

- Parco dei Gessi Bolognesi e Calanchi Dell'Abbadessa; località Ca' de Mandorli (44°26' 32" N, 11°26' 30" E);
- Parco dei Gessi Bolognesi e Calanchi Dell' Abbadessa; località Ciagnano (44°24' 57" N, 11°27' 16" E);
- Parco Regionale Abbazia di Monteveglio (44°28' 01 " N, 11°5' 14" E).

In provincia di Ravenna l'area campionata è stata:

- Parco del Carnè (44°13' 34" N, 11°44' 22" E).

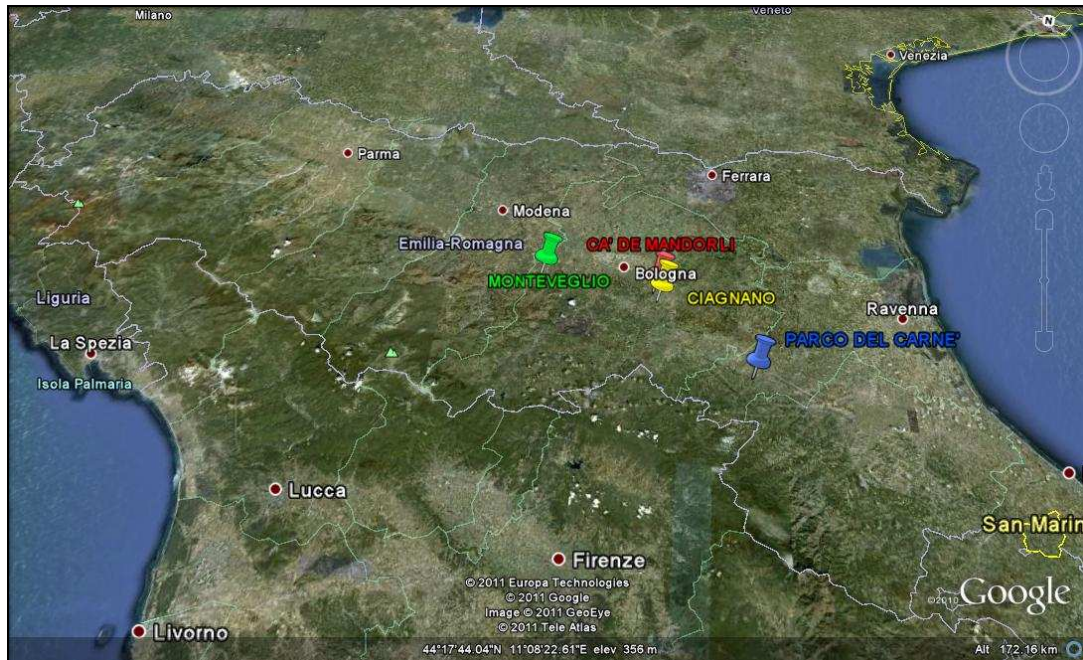


Figura 5.2: Luoghi campionati nella regione Emilia-Romagna

#### 5.1.2.1 Parco dei Gessi Bolognesi e Calanchi Dell'Abbadessa

Il Parco Regionale dei Gessi Bolognesi e dei Calanchi dell'Abbadessa (Fig. 5.3) si sviluppa sulle prime pendici della collina bolognese, nelle immediate vicinanze del capoluogo emiliano (San Lazzaro di Savena, Ozzano dell'Emilia e Pianoro), tra i torrenti Savena, Zena, Idice e Quaderna e racchiude un territorio in cui spiccano gli spettacolari affioramenti dei gessi messiniani e i caratteristici calanchi del Passo dell'Abbadessa. Doline, calanchi, altopiani, valli cieche e rupi rocciose modellano il territorio lungo una fascia che, sviluppandosi in modo discontinuo trasversalmente alle valli, termina verso est nella imponente Vena del Gesso romagnola (anch'essa parte del sistema delle aree protette regionali). Il fiume Savena segna per un lungo tratto il confine occidentale dell'area protetta che a est si spinge sino al suo piccolo affluente Quaderna; nella sua parte centrale è situata la confluenza fra Zena e Idice.

- **Superficie a terra (ha):** 4.815,87
- **Comuni:** Bologna, Ozzano dell'Emilia, Pianoro, San Lazzaro di Savena





Figura 5.3: Parco dei Gessi e dei calanchi dell'Abbadessa, mappa del parco

#### Flora e fauna del parco

Il parco è caratterizzato da rupi gessose rivestite di vegetazione ridotta e discontinua alternate a zone boschive ricche di siepi ed arbusteti.

La morfologia del terreno influisce sul microclima e di conseguenza sulla tipologia di vegetazione. Nella valle si riscontra principalmente la presenza di vegetazione termofila nelle zone più elevate, mentre nelle zone più prossime al fondo si sviluppa una vegetazione mesofila e sciafila (vi si possono incontrare anche piante tipiche di fasce altitudinali più elevate, come, ad esempio, il castagno). Nelle zone in cui la roccia è scoperta si crea un microclima particolarmente caldo e arido che favorisce lo sviluppo di specie mediterranee generalmente inconsuete. I boschi sono caratterizzati da alberi di roverella, carpino nero, acero campestre, tiglio e castagno. Numerosi sono gli arbusti nel sottobosco tra cui nocciolo, corniolo, sanguinella coronilla, biancospini e fusaggine, spesso ricoperti di caprifoglio e vitalba. Sul fondo delle doline e agli ingressi degli inghiottitoi si registra un microclima fresco e umido, dovuto al ristagno di aria fredda, che favorisce lo sviluppo di piante normalmente riscontrate a quote superiori.

Nonostante l'estrema vicinanza all'area urbana bolognese, grazie al suo microclima ed ai differenti habitat, il parco ospita numerose specie animali.

Sono infatti segnalati piccoli roditori come il mustiolo (*Suncus etruscus*), donnole, lepri, volpi, caprioli, cinghiali, alcuni lupi, documentati dal bollettino del parco, e sono state rinvenute anche tracce di lince. Tra gli uccelli si registrano lo scricciolo (*Troglodytes troglodytes*), l'occhiocotto (*Sylvia melanocephala*), varie specie di picchio (*Picus viridis*; *Sitta europaea*, *Dendrocopos major*), l'assiolo (*Otus scops*), la poiana (*Buteo buteo*), il martin pescatore (*Alcedo atthis*), il fagiano (*Phasianus colchicus*), oltre a numerosi esemplari di sterpazzola (*Sylvia communis*), tortora (*Streptopelia turtur*), succiacapre (*Caprimulgus europaeus*), averla piccola (*Lanius*

collurio), strillozzo (*Miliaria calandra*), usignolo (*Luscinia megarhynchos*), capinera (*Sylvia atricapilla*), cinciallegra (*Parus major*), merlo (*Turdus merula*), gazza (*Pica pica*), corvo imperiale (*Corvus corax*), allodola (*Alauda arvensis*) e qualche rara upupa (*Upupa epops*). Ci sono inoltre diverse specie di rettili come il ramarro (*Lacerta viridis*), le lucertole (*Podarcis sicula* *Podarcis muralis*), il biacco (*Hierophis viridiflavus*). Tra gli anfibi si segnalano il tritone crestato (*Triturus cristatus*) e il tritone punteggiato (*Triturus vulgaris*), la raganella (*Hyla arborea*) e l'ululone dal ventre giallo (*Bombina variegata*), rana in pericolo di estinzione (<http://www.parks.it/parco.gessi.bolognesi/>).

#### 5.1.2.2 Località Ca' de Mandorli

La zona, un tempo occupata da cave di ghiaia, presenta oggi un notevole interesse naturalistico in quanto gli scavi dei depositi alluvionali del Pleistocene inferiore-medio, hanno lasciato varie depressioni in cui sono presenti zone umide che offrono ricovero a diverse specie migratorie.

Un percorso circolare e attrezzato con torrette di avvistamento consente di visitare l'area e si connette all'itinerario lungo l'Idice che risale il corso d'acqua per un lungo tratto.

Questa località si trova ad un'altitudine di 66 metri s.l.m.; in questa sede sono stati campionati due siti denominati zona 1 e zona 2.

#### ZONA 1

Questa area (Fig. 5.4) si trova in prossimità di un sentiero ricoperto di ghiaia e separato dall'area di campionamento da una bassa staccionata di legno. L'area è composta da una vegetazione di piccoli alberi del sottobosco, il suolo non possiede alcun manto erboso ed è ricoperto da foglie e piante rampicanti che si estendono su alcuni tratti del terreno. Ai margini dell'area scelta si sviluppa una parete in cui ci sono alberi di maggiori dimensioni. L'area campionata ha dimensioni di 35 m<sup>2</sup>.

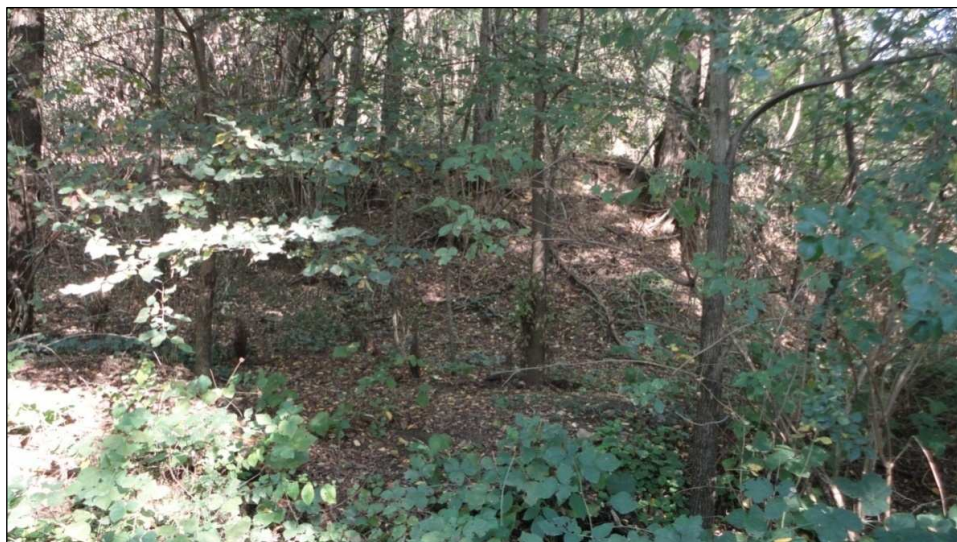


Figura 5.4: Ca' de Mandorli-Zona 1



## ZONA 2

Questo sito (Fig.5.5) a differenza della zona 1 si presenta ricco di vegetazione, il suolo è ricoperto da un manto costituito da varie specie di piante erbacee e da alberi a medio fusto; la zona, molto soleggiata con un'alternanza a macchie di zone d'ombra e zone esposte al sole, è stata campionata selezionando un percorso lineare di 100 metri e suddiviso in *transect* da 20 metri. Il percorso inizia da una zona molto ricca di vegetazione e con il suolo ricoperto da erba alta, si snoda attorno a una collinetta e termina in un'ampia vallata con pochi e diradati alberi. Al termine di questo percorso, a circa venti metri dalla fine, abbiamo trovato una di pozza di fango frequentata dai cinghiali della zona, inoltre abbiamo avvistato un capriolo durante il campionamento, segno che la zona è ricca di fauna selvatica e quindi di potenziali ospiti per le zecche.



Figura 5.5: Ca' de Mandorli-Zona 2

### 5.1.2.3 Località Ciagnano

Questa località si trova a un'altitudine di 240 metri s.l.m., la zona è percorsa da un sentiero naturalistico che collega Castel de' Britti, Ciagnano e Settefonti; la flora e la fauna sono ricche e variegata, durante i campionamenti abbiamo avvistato varie specie di mammiferi e uccelli.

I campionamenti sono stati effettuati in due zone diverse lungo il sentiero naturalistico, effettuando il flagging a monte del sentiero (Kramer e Beesley, 1993).

## ZONA 1

Il percorso scelto misura 100 m e di questo abbiamo campionato 3 *transect* di 20 metri ciascuno. Nel *transect* 1 il suolo si presenta come un terreno coperto da foglie e piante rampicanti come l'edera. Segue dopo 20 metri il *transect* 2 che percorre il sentiero lungo un tratto di scalini di legno. Il *transect* 3 (Fig. 5.6) è l'ultimo tratto ed è, a differenza degli



Figura 5.6: Ciagnano: zona 1, *transect* 3



altri, ricoperto da molte foglie secche di quercia lungo i lati del sentiero. Tutto il percorso è in ombra.

## ZONA 2

Questo tratto segue il margine del sentiero che si snoda attraverso una fitta vegetazione, con un'alternanza di zone di luce e ombra. Anche questo tratto presenta un suolo coperto di foglie, principalmente nei primi due *transects* (Fig. 5.7 a,b), mentre nel *transect* 3 (Fig. 5.7 c) è presente un manto erboso alternato a zone di terreno più o meno arido in funzione della stagione; quest'ultimo tratto del percorso campionato si trova in una zona soleggiata per gran parte della giornata.



Figura 5.7 a,b,c: Ciagnano: zona 2, *transect* 1, *transect* 2, *transect* 3

### 5.1.2.4 Parco Regionale Abbazia di Monteveglio

E' il più piccolo tra i Parchi regionali dell'Emilia Romagna; il parco ha un'area di un migliaio di ettari sulle colline che si innalzano alle spalle di Monteveglio, un paesaggio variegato nel quale vigneti e frutteti si alternano a ripidi versanti boscosi. Il mosaico di coltivi, siepi e macchie di bosco viene interrotto dai calanchi. Accanto agli ambienti naturali ci sono i resti del castello di Matilde di Canossa e l'abbazia di Santa Maria.

#### Flora e Fauna

La variegata copertura vegetale del Parco, conseguenza della grande varietà di rocce affioranti, offre senza dubbio una efficace sintesi degli aspetti naturali e paesaggistici della collina bolognese, dove si alternano praterie, coltivazioni, arbusteti, boschi e vigneti. Un ambiente che testimonia lo storico intreccio tra dinamiche naturali e intervento dell'uomo.

Nel paesaggio del parco si trovano boschi non molto estesi. In prevalenza si tratta di boschi cedui modellati dagli interventi dell'uomo, che nei secoli ha destinato i terreni

più produttivi all'agricoltura, mantenendo le zone del bosco come riserve di legname per il riscaldamento e per vari impieghi nel podere. I boschi si trovano in prevalenza sui versanti ripidi o esposti a nord e si interrompono in maniera repentina quando dai terreni marnosi si passa alle aree dei calanchi, dove le argille non consentono la crescita di un bosco stabile.

I pendii soleggiati ospitano boschi xerofili, cioè soggetti a periodi di aridità soprattutto nei mesi estivi, dominati da una varietà di quercia, la roverella, alla quale si accompagnano l'orniello o frassino minore e arbusti di citiso, vescicaria, coronilla e viburno. Nel sottobosco tappezzato di graminacee emergono i fusti sempreverdi del pungitopo.

Sui versanti ombrosi crescono boschi misti di tipo mesofilo, caratterizzati da una maggiore umidità per tutto l'anno, dove alla roverella si uniscono il carpino nero, l'orniello, l'acero, il nocciolo, il corniolo e i fusti lianosi di edera. Il sottobosco è ricco di muschi e funghi; all'inizio della primavera il manto erboso si ricopre di fiori.

Lungo il fondovalle dei torrenti e intorno alle piccole raccolte d'acqua artificiali si incontra una vegetazione di tipo igrofilo, caratteristica dei luoghi con elevata e costante umidità.

La varietà di ambienti che caratterizza il parco favorisce senza dubbio un notevole grado di biodiversità, creando le condizioni ottimali per una fauna diversificata e numericamente apprezzabile.

Nel parco vivono molti mammiferi tipici dei boschi e delle aree marginali della collina. Sono presenti il riccio (*Erinaceus europaeus*), lo scoiattolo (*Sciurus vulgaris*), il ghio ( *Glis glis*), il moscardino (*Muscardinus avellanarius*) e l'arvicola rossastra (*Clethrionomys glareolus*), frequenti nelle aree boschive, dove si distribuiscono tra il sottobosco e le chiome degli alberi a seconda delle abitudini alimentari e riproduttive. Negli spazi aperti si incontrano lepri e arvicole campestri (*Microtus arvalis*) mentre nei pressi dei corsi d'acqua si notano le gallerie dell'arvicola terrestre (*Arvicola terrestris*). Tra le specie di taglia maggiore sono presenti la volpe e altri carnivori come il tasso (*Meles meles*), la donnola e la faina (*Martes foina*), ormai adattati a trarre profitto dalla convivenza con l'uomo. Negli ultimi anni ha fatto ritorno il capriolo, da tempo assente dalla collina, che sta riconquistando boschetti cedui, arbusteti e campi abbandonati, che rappresentano il suo habitat naturale e sono ben distribuiti all'interno dell'area protetta. Recente è anche l'apparizione del cinghiale.

L'avifauna del Parco è molto ricca e numericamente apprezzabile. Complessivamente sono note circa 140 specie di uccelli, 68 delle quali nidificanti. Nei boschi cedui e negli intricati arbusteti trovano ospitalità molti piccoli passeriformi come usignolo, capinera, scricciolo, pettirosso (*Erithacus rubecula*), merlo (*Turdus merula*), fringuello (*Fringilla coelebs*) e lui piccolo (*Phylloscopus collybita*). I tipici fori circolari che si notano su molti pioppi senescenti segnalano la presenza del picchio rosso maggiore e del picchio verde. Queste cavità vengono spesso utilizzate per la nidificazione da altri uccelli, come il picchio muratore e varie specie di cince e sono particolarmente importanti nei giovani boschi cedui, dove la mancanza di siti adatti riduce la potenziale presenza di specie. Nel folto dei boschi si trovano anche ghiandaia (*Garrulus glandarius*) e cuculo (*Cuculus canorus*). Coltivi abbandonati e altri spazi aperti sono frequentati da verdone (*Chloris chloris*), cardellino (*Carduelis carduelis*) e zigolo nero (*Emberiza cirlus*). Molto comune in questi ambienti è il fagiano, al quale in estate si aggiunge un altro galliforme, la quaglia (*Coturnix*

*coturnix*).

Il gheppio (*Falco tinnunculus*) si spinge anche nelle aree calanchive e la poiana (*Buteo buteo*) abita stabilmente in tutto il settore centrale dell'area protetta. Lungo le rive di Samoggia e Ghiaia è possibile sorprendere, soprattutto durante il periodo estivo, aironi cenerini (*Ardea cinerea*) e altri ardeidi che si spostano lungo i corsi d'acqua alla ricerca di pesci intrappolati in pozze isolate.

Le scarpate, i coltivi abbandonati e in genere le aree assolate sono l'habitat ideale per varie specie di rettili, mentre nel fondovalle e nelle raccolte d'acqua è possibile osservare una notevole varietà di anfibi. Facili da avvistare sono biacco (*Hierophis viridiflavus*) e colubro di Esculapio (*Zamenis longissimus*), entrambi innocui e abituali frequentatori della fascia collinare, dove è possibile incontrare anche il colubro liscio (*Coronella austriaca*), un piccolo cacciatore di lucertole. In prossimità dei torrenti principali, ma anche nel sottobosco umido dei versanti esposti a nord, si può osservare la natrice dal collare (*Natrix natrix*). Oltre alle comuni lucertole (*Podarcis muralis*, *P. sicula*), è facile incontrare il ramarro e la luscengola (*Chalcides chalcides*).

Nel fondovalle umido del rio Ramato si trovano diverse specie di anfibi della collina che, dalla fine dell'inverno e per tutta la primavera, vi affluiscono talvolta in gran numero per compiere la fase riproduttiva. Il più abbondante è il rospo comune (*Bufo bufo*), che predilige i boschi freschi ma si spinge senza difficoltà in tutti gli altri ambienti terricoli. La raganella (*Hyla arborea*) ha invece abitudini più arboricole ma in primavera la si può incontrare nascosta tra le canne e gli arbusti intorno a qualcuno dei piccoli specchi d'acqua del parco, frequentati anche dalla rana agile (*Rana dalmatina*), che nel resto dell'anno vive al riparo del sottobosco. In stagni e pozze, infine, trascorrono la fase larvale anche tritone crestato e tritone punteggiato (<http://www.parcoabbazia.it/>).

Monteveglia si trova ad un'altitudine di 252 metri s.l.m.; nel nostro studio sono state campionate tre zone lineari: zona 1, zona 2, zona 3.



Figura 5.8: Monteveglia, mappa e vista satellitare (<http://maps.google.it/>)

## ZONA 1

La zona 1 (Fig. 5.9a) è composta da un percorso rettilineo di 100 metri, lungo un sentiero naturalistico in cui troviamo un manto erboso, che ricopre il sentiero, e una vegetazione per lo più arbustiva ai lati dello stesso. La zona è soleggiata nel

pomeriggio durante il periodo estivo. Il percorso è stato campionato in 3 *transects* da 20 metri ciascuno.

#### ZONA 2

La zona 2 (Fig. 5.9b) è costituita da un percorso di 100 metri che include 3 *transects* da 20 metri in cui sono stati effettuati i campionamenti.

Il percorso si presenta con zone in ombra e zone soleggiate e si snoda lungo il sentiero naturalistico che fiancheggia inizialmente un bosco e nell'ultimo tratto una siepe. Il suolo nei primi due *transects* è battuto e scarso di vegetazione al centro, mentre ai margini del sentiero appare ricoperto da foglie secche in prossimità degli alberi, mentre, nel terzo *transect* il bordo del sentiero è coperto da un tappeto erboso.

#### ZONA 3

La zona 3 (Fig. 5.9c) è anch'essa costituita da un percorso lineare che però a differenza dei precedenti è di soli 80 metri con 2 *transects* (iniziale e finale) campionati di 30 metri ciascuno. Il percorso ha tratti in ombra e tratti esposti al sole ed è rappresentato dal margine di una zona di prato costeggiata da arbusti.

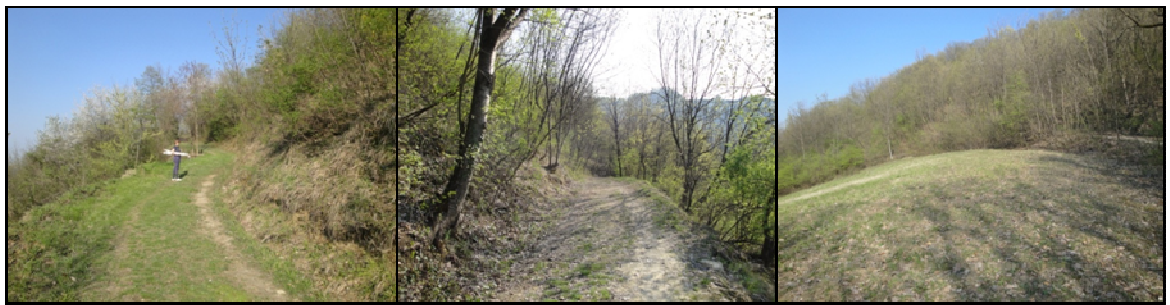


Fig 5.9 a,b,c: Monteveglio zone 1-2-3

#### 5.1.2.5 Parco del Carnè

Il Parco naturale attrezzato del Carnè è un'area di proprietà pubblica di estremo interesse paesaggistico e naturalistico nei Gessi di Rontana e Castelnuovo. E' stato istituito nel 1973 dalla Provincia di Ravenna e dai Comuni di Brisighella e di Faenza. Attualmente la superficie del Parco è di 43 ettari (Fig. 5.10).

Nel territorio del Parco si aprono numerose cavità carsiche, per lo più a sviluppo prevalentemente verticale: tra queste gli abissi Fantini e Garibaldi, sotto il Monte di Rontana e, meno profondi, l'Abisso Carnè e l'Abisso Faenza.

Il sottosuolo è attraversato da uno dei più articolati collettori ipogei della Vena del Gesso, solo in parte esplorato. Le doline si susseguono senza soluzione di continuità e non mancano altre forme di dissoluzione tra le quali spiccano erosioni a candela.

#### Flora e fauna

La copertura arborea può vantare la presenza, accanto ai consueti carpino nero, orniello e roverella, di specie più rare e di ecologia tra loro diversissima: l'acero minore e il tiglio selvatico.

A brevissima distanza dalle specie tipicamente termofile e xerofile (tolleranti



all'aridità) che punteggiano le falesie rivolte a Sud, troviamo sulle pendici nord piante igrofile o microterme normalmente reperibili a quote decisamente più elevate. La fauna è estremamente ricca di anfibi, rettili, uccelli e mammiferi. Gli affioramenti gessosi possono ospitare numerose specie di insetti e coleotteri. Tra gli uccelli vanno segnalate civette, allocchi, barbagianni e almeno una coppia di gufi reali (*Bubo bubo*), e l'assiolo, più altri rapaci diurni come il gheppio, la poiana, l'albanella minore (*Circus pygargus*) e il lodolaio (*Falco subbuteo*). Oltre a questi rapaci, è presente anche l'occhiocotto; tra i mammiferi si segnalano l'istrice, il tasso, la faina, la donnola e la puzzola e varie specie di chiroteri (*Myotis*, *Rhinolophus* e *Miniopterus*).

Degna di interesse è la componente faunistica della Vena del Gesso, che ospita molte specie di anfibi, rettili, uccelli e mammiferi: vanno ad esempio rimarcate due segnalazioni particolarmente importanti, relative alla nidificazione di almeno una ed alla certa stanzialità dell'istrice, grande roditore mediterraneo fino a qualche anno fa non usuale a queste latitudini.

Purtroppo, in contrapposizione a questi aspetti positivi, molti sono quelli negativi. I rapaci, presenti fino al 1950 in cospicuo numero, sono attualmente rappresentati da pochi esemplari anche se la potenzialità dell'ambiente è molto maggiore. La caccia indiscriminata è senza dubbio stata la causa principale della loro rarefazione (<http://www.venadelgesso.org/itinerari/brisighella/parcocarne.htm>).

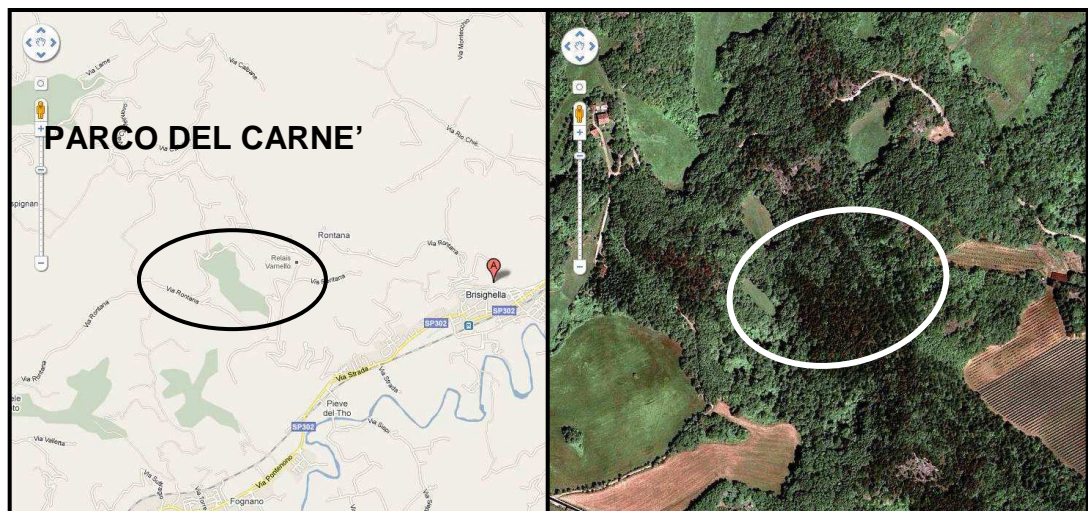


Figura 5.10: Parco del Carnè, mappa e vista satellitare (<http://maps.google.it/>)

Il parco ha una altitudine di 387 metri s.l.m.

In questo parco abbiamo campionato tre zone con diverse tipologie d'uso e di terreno denominate: zona 1, zona 2, zona 3. I campionamenti, a differenza degli altri parchi, sono iniziati a maggio, in quanto in precedenza il parco era chiuso al pubblico e quindi non accessibile.

#### ZONA 1

Questa zona è rappresentata da un'area di 236 metri<sup>2</sup>, comprendente una zona giochi, un'area da picnic e un'area periferica che circonda queste due.

Area giochi: (Fig. 5.11a) comprende uno scivolo per bambini e la zona attorno ad esso, è a tratti soleggiata e il suolo si presenta coperto da un manto erboso ad esclusione della porzione di suolo sotto la costruzione ludica che si presenta priva di erba e con il terreno pressato.

Area da picnic: (Fig. 5.11b) comprende due tavoli da picnic, la zona è in ombra e il suolo si presenta battuto e coperto da un abbondante fogliame secco.

Area periferica: una parte è situata al di sopra dei tavoli da picnic (Fig. 5.11c) e si presenta in ombra e il suolo è coperto da un abbondante fogliame alternato da zone verdi di cespugli e piante. Infine la parte che si trova al di sotto della zona dei tavoli, (Fig. 5.11d) è costituita da un piccolo sentiero che si affaccia su una strada ghiaia, che costituisce il sentiero di passeggiata principale del parco. Il suolo è come il precedente, ma rispetto a quest'ultimo si presenta più ricco di vegetazione erbacea e arbustiva



Figura 5.11 a,b,c,d: Parco del Carnè, zona 1

## ZONA 2

Questa zona è caratterizzata da un percorso lineare di 100 metri, campionato in fasce da 20 metri ciascuna; essendo questo percorso molto vario verranno descritti separatamente i 3 *transects* campionati.

### Transect 1

Questo *transect* (Fig. 5.12a) è costituito da un percorso di 20 metri che costeggia un piccolo ammasso di rocce granitiche che bordano uno stretto passaggio che si apre in un grande prato verde isolato dal sentiero principale del parco. Il suolo è in penombra e vi è un alternanza di rocce, sassi, fogliame e vegetazione erbacea.

### Transect 2



Percorso lineare di 20 metri che attraversa una zona picnic passando sotto e attorno ai tavoli di legno. Quest'area è avvolta da una fitta vegetazione che ricopre la parete di rocce dietro a questa. Sul davanti dell'area picnic si stende uno spiazzo di grandi dimensioni e mantenuto con un prato all'inglese (Fig. 5.12b).

### Transect 3

Ultimo *transect* lineare di 20 metri che si trova in un'area del sottobosco dove gli alti alberi creano sul suolo zone di luci e di ombre. Il tratto iniziale parte da una zona coperta da edera, arbusti e piante per continuare e terminare sul sottosuolo boschivo costituito da terreno più o meno privo di vegetazione e coperto da foglie e rami secchi (Fig. 5.12c).



Figura 5.12: Parco del Carnè, zona 2, *transects* 1, 2, 3.

### ZONA 3

Questo tratto campionato è formato da 3 *transect* di 20 metri ciascuno selezionati in un percorso di 100 metri che costeggia uno sentiero naturalistico che si snoda tra la fitta vegetazione boschiva (Fig. 5.13).

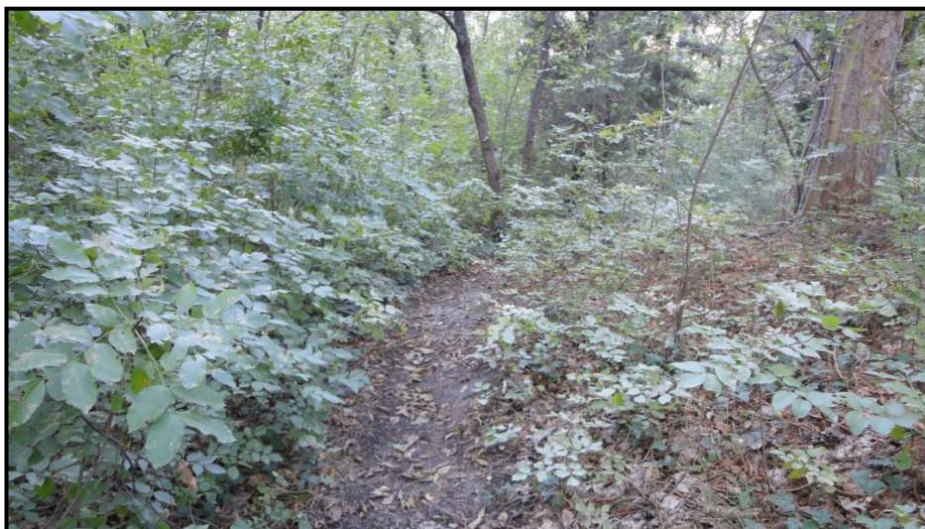


Figura 5.13: Parco del Carnè, zona 3, *transect* 1.



### 5.1.3 FEEDING TICKS

Le zecche sono state raccolte anche durante il pasto di sangue su varie specie animali (cani, cavalli, bovini e un gatto) o sull'uomo nelle stesse zone in cui sono stati effettuati i campionamenti dall'ambiente. Questi artropodi sono stati forniti da veterinari liberi professionisti o da persone che segnalavano il rinvenimento di zecche in seguito alla frequentazione di queste aree a scopo ricreativo.

### 5.1.4 CONSERVAZIONE E IDENTIFICAZIONE DELLE ZECCH

Le zecche raccolte dall'ambiente, dagli animali e dalle persone sono state prelevate con delle pinzette e inserite immediatamente in provette contenenti alcool etilico a 70 gradi. Ogni provetta è stata identificata con un'etichetta in cui veniva segnata data, luogo e zona di prelievo.

In laboratorio ciascuna zecca è stata identificata con l'ausilio dello stereomicroscopio utilizzando le chiavi morfologiche di Manilla (1998) e di Iori (2005).

### 5.1.5 ANALISI DEI DATI

Per quanto riguarda le zecche raccolte dall'ambiente, in riferimento alla sola specie *I. ricinus*, maggiormente rappresentata, è stato calcolato l'indice di abbondanza (IA), espresso come il numero di zecche raccolte su 100 m<sup>2</sup>, sia per le larve (IAL) sia per le ninfe (IAN) sia per gli adulti (IAA), calcolato secondo la formula:

$$IA = TR \times 100/a$$

dove TR è il numero di *I. ricinus* raccolte e *a* è la superficie dell'area campionata espressa in metri quadrati (Barandika e coll., 2010).

Questo indice è stato utilizzato per comparare l'abbondanza di queste zecche ixodidae nei diversi luoghi di raccolta, nei diversi momenti di raccolta o in riferimento ai diversi valori di temperatura e umidità relativa al suolo, registrati al momento della cattura, e infine in relazione alle differenti caratteristiche della vegetazione ("sottobosco" o "manto erboso").

Il test non parametrico di Kruskal-Wallis è stato utilizzato per valutare le differenze per quanto riguarda l'abbondanza tra le diverse località.

Il test Rho di Spearman è stato utilizzato per valutare la correlazione tra l'IA di larve, ninfe e adulti con temperature e umidità relative osservate a 5 cm dal suolo.

Per valutare l'eventuale presenza di variazioni macroclimatiche tra le diverse località campionate, sono stati raccolti i dati di temperatura e umidità relativa registrati dalle centraline ARPA poste più vicino ai parchi ([www.arpa.emr.it](http://www.arpa.emr.it)) durante l'intero periodo di campionamento.

## 5.2 RICERCA DI PATOGENI TRASMESSI DALLE ZECCHIE

### 5.2.1 ALLESTIMENTO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Una volta identificate, le zecche sono state preparate per l'estrazione del DNA, valutando sia lo stadio di sviluppo della zecca, sia il punto di raccolta. Sulla base di riferimenti bibliografici (Cassini e coll., 2010) sono stati costituiti dei pool contenenti 5 ninfe o 10 larve, mentre gli adulti sono stati processati singolarmente, in modo tale da ottenere un idoneo quantitativo di materiale genetico per le indagini successive. Ciascun pool di ninfe e/o di larve, era costituito da zecche raccolte nella stessa zona e nella stessa giornata.

In totale sono stati analizzati 1.622 soggetti, per un totale di 393 campioni, così suddivisi:

- 330 larve (utilizzate per formare 33 pool);
- 1.165 ninfe (utilizzate per formare 233 pool);
- 127 adulti (59 campionati dall'ambiente e 68 dagli animali e dalle persone)

Tra le zecche campionate in fase di alimentazione, sono stati analizzati solamente gli adulti, in quanto sono state rinvenute solo 5 ninfe da ospiti diversi, non sufficienti a creare un pool. Le zecche adulte sono state tutte analizzate singolarmente.

I singoli campioni sono stati identificati con un numero progressivo e una sigla riferita alla zona di campionamento per le "questing ticks" (CM=Cà de Mandorli; CG=Ciagnano; MV=Monteveglia; CR=Carnè), con la sigla AN per le "feeding ticks".

Lavaggio delle zecche: per rimuovere l'alcool in cui erano state conservate le zecche, ogni campione è stato sottoposto a due lavaggi immergendo in PBS, centrifugando per circa 1 minuto a 10.000 x g.

Le zecche di ogni campione sono quindi state tagliate con lama da bisturi sterile per facilitarne la lisi e sono state raccolte in eppendorf da 1.5 ml.

### 5.2.2 ESTRAZIONE DEL DNA

L'estrazione del DNA è stata eseguita utilizzando il KIT NUCLEOSPIN TISSUE (Macherey-Nagel, Duren, Germany) che sfrutta un sistema di colonnine dotate di un filtro costituito a membrana di gel di silice, ad alta affinità per il DNA, che permette una rapida ed efficiente purificazione del DNA cellulare.

La metodica utilizzata è quella prevista dalla ditta produttrice con alcuni adattamenti. Fasi dell'estrazione:

- ❖ pre-lisi: ai campioni di zecca lavati e sminuzzati sono stati aggiunti 180 µl di buffer T1 e 25 µl di proteinasi K, vortexando poi per mescolare; le eppendorf sono state poste in incubazione "overnight" in termoblocco a 56°C, vortexando occasionalmente per facilitare la lisi;
- ❖ lisi: i campioni sono stati vortexati e sono stati addizionati di 200 µl di buffer B3; dopo un ulteriore passaggio su vortex, si è proceduto con un'incubazione a 70°C in termoblocco per 30 minuti (il protocollo originale prevedeva 10 minuti). Dopo aver vortexato brevemente, i campioni sono stati

centrifugati per 5 minuti ad alta velocità (11.000 x g.) ed il surnatante contenente il DNA è stato trasferito in un nuovo tubo, facendo attenzione a non prelevare frammenti di zecca;

- ❖ aggiustamento delle condizioni di legame del DNA: 210 µl (il protocollo originale prevedeva 200µl) di etanolo (96-100%) raffreddato a -20°C sono stati aggiunti ai campioni che sono poi stati vortexati vigorosamente; dopo l'aggiunta dell'etanolo può essere visibile un precipitato, ma questo non interferisce con l'isolamento del DNA;
- ❖ legame DNA: per ogni campione è stata preparata una colonnina in un tubo da 2ml, i campioni sono stati trasferiti nelle colonnine e centrifugati poi per 1 minuto a 11.000 x g. Al termine della centrifugazione il tubo di raccolta è stato eliminato e la colonnina è stata trasferita in un nuovo tubo. Se il campione non scendeva completamente attraverso la matrice, si è ripetuta la centrifugazione a 11.000 x g;
- ❖ lavaggio della membrana di silice: il primo lavaggio è stato effettuato con 500 µl di buffer BW seguito da una centrifugazione di 1 minuto a 11.000 x g.; la colonnina è stata poi trasferita in un nuovo tubo e sottoposta al secondo lavaggio con 600 µl di buffer B5 sempre seguito da centrifugazione per 1 minuto a 11.000 x g.; infine il tubo con il buffer è stato eliminato e la colonnina posta in un nuovo tubo;
- ❖ asciugatura della membrana di silice: la colonnina è stata centrifugata per 3 minuti a 11.000 x g. per rimuovere residui di etanolo;
- ❖ eluizione del DNA: nella colonnina, posta in una eppendorf da 1.5ml, sono stati aggiunti 50 µl di buffer BE preriscaldato a 70°C; i campioni sono stati infine incubati a temperatura ambiente per 1 minuto e centrifugati per 1 minuto a 11.000 x g.

Il DNA, eluito attraverso l'ultimo passaggio in centrifuga, è stato conservato in congelatore alla temperatura di -20°C fino al successivo utilizzo.

### 5.2.3 RICERCA DI PIROPLASMI

#### 5.2.3.1 PCR

Su tutti i campioni di DNA estratti, è stata eseguita una PCR per la ricerca dei piroplasmii utilizzando i primer specifici PIRO A (5' AAT ACC CAA TCC TGA CAC AGG G 3') e PIRO B (5' TTA AAT ACG AAT GCC CCC AAC 3'); questi amplificano un segmento di circa 400bp del 18S rRNA (Armstrong e coll.,1998).

La mix utilizzata per la PCR, in un volume di 50 µl, è stata la seguente:

- H<sub>2</sub>O 34.5 µl;
- Buffer 5 µl;
- MgCl 2 µl;
- dNTP 1 µl;
- PIRO A 1 µl;
- PIRO B 1 µl;
- Taq (2.5 unità) 0.5 µl;
- DNA 5 µl

I reagenti utilizzati sono Euro Clone (Milano, Italia), ad eccezione dei dNTP (Fermentas-Gmbh, St. Leon-Rot, Germany) e dei primer (MWG, Germania).

I primer, inviati liofilizzati dal produttore, sono stati ricostituiti in laboratorio a 100 pmoli; nella reazione sono stati impiegati ad una concentrazione di 20 pmoli.

Il ciclo di amplificazione è stato condotto in un termociclatore (Whatman Biometra, Germania) e prevedeva il seguente protocollo:

Fase iniziale	DENATURAZIONE	94°C per 1 minuto
40 Cicli	DENATURAZIONE	94°C per 45 secondi
	ANNEALING	58°C per 45 secondi
	ESTENSIONE	72°C per 45 secondi
Fase finale	ESTENSIONE FINALE	72°C per 7 minuti

Tab. 5.1. Protocollo del ciclo di amplificazione del 18s rRNA dei piroplasmi.

Per verificare l'esito della PCR, l'amplificato è stato sottoposto a corsa elettroforetica su gel all' 1% di Agarosio (Sigma, St. Louis MO, USA) con SYBR-SAFE DNA Gel Stain 0.5X TBE (Invitrogen Ltd, Paisley, UK) a 100V per 30 minuti. La lettura è stata eseguita visualizzando il gel sul transilluminatore (Invitrogen).

Come controllo positivo è stato utilizzato un campione di sangue bovino positivo per *Babesia* spp., mentre come controllo negativo è stata utilizzata acqua sterile.

Come marker, è stato usato: O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder ready-to-use (Fermentas).

#### 5.2.3.2 PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI PCR

I campioni risultati positivi alla PCR sono stati purificati utilizzando il KIT NUCLEOSPIN EXTRACT II (Macherey-Nagel, GmbH, Duren, Germania), secondo il protocollo previsto dal produttore:

- ❖ correzione delle condizioni di legame del DNA: i campioni positivi sono stati portati ad un volume di 50 µl con buffer TE;
- ❖ legame del DNA: per ogni campione è stata preparata una colonnina che è stata posta in un tubo da 2 ml ed è stato caricato il template; dopo una centrifugazione di 1 minuto a 11.000 x g., è stato eliminato il tubo di raccolta e la colonnina è stata messa in un nuovo tubo;
- ❖ lavaggio della membrana di silice: sono stati aggiunti 600 µl di buffer NT3 ed in seguito è stata effettuata un'altra centrifugazione di 1 minuto a 11.000 x g.; come sopra è stato eliminato il tubo e la colonnina è stata messa in un nuovo tubo
- ❖ asciugatura della membrana di silice: i campioni sono stati centrifugati per 2 minuti a 11.000 x g. per rimuovere il buffer NT3; oltre alla centrifugazione, per ottenere una più completa rimozione dei residui di etanolo e di buffer NT3 che possono inibire successive reazioni, le colonnine sono state messe ad incubare con il tappo aperto per 2-5 minuti a 70°C prima dell'eluizione;
- ❖ eluizione del DNA: la colonnina è stata messa in una eppendorf da 1.5 ml e sono stati aggiunti 30 µl di acqua preriscaldata a 70°C; la colonnina è stata

incubata a temperatura ambiente per 1 minuto, in modo tale da aumentare la resa di eluizione del DNA, e si è effettuata un'ultima centrifugazione per 1 minuto a 11.000 x g..

Terminata la purificazione, è stata effettuata la quantificazione del DNA contenuto nei campioni utilizzando lo spettrofotometro (Eppendorf; Amburgo, Germania).

Il sequenziamento è stato effettuato presso la ditta BMR Genomics (Università di Padova) che utilizza come sequenziatore l' ABI-3730XL analyzer.

Il quantitativo di DNA da spedire per il sequenziamento, è stato calcolato secondo le istruzioni della ditta, tenendo presente che per ogni 100 pb del frammento bisognava inviare 3 ng di campione; il nostro frammento era di 400 bp e di conseguenza servivano 12 ng. E' stata fatta quindi la proporzione in base alla concentrazione di ogni singolo campione ottenuta allo spettrofotometro (ng/μl).

Al campione così dosato è stato aggiunto 1 μl di primer PIRO B diluito a 10 pmoli. I campioni infine sono stati fatti seccare a 65°C per circa 1 ora e 30 minuti in un termoblocco, lasciando il tappo delle eppendorf aperto.

#### 5.2.3.3 ANALISI FILOGENETICA

Le sequenze sono state corrette mediante analisi visuale degli elettroferogrammi utilizzando il programma Bioedit v 7.0.5 (Hall, 1999) e sono poi state analizzate su BLAST (Altschul e coll., 1990), nella *home page* del National Center of Biotechnology Information, testandole verso le sequenze di 18S-rRNA di *Babesia* spp. e *Theileria* spp. presenti nel database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Le sequenze ottenute e quelle più simili a loro depositate su BLAST, sono state utilizzate per costruire gli alberi filogenetici.

Le sequenze sono state allineate su Bioedit e gli alberi filogenetici sono stati costruiti tramite il programma Mega 5 (<http://www.megasoftware.net>) utilizzando neighbour-joining (Saitou e Nei, 1987) ed il modello di Kimura 2- parametri (Kimura, 1980).

La tipologia dell'albero è stata valutata mediante 1000 ripetizioni in analisi bootstrap.

#### 5.2.3.4 ANALISI STATISTICA

È stato effettuato il test del  $\chi^2$  per confrontare la prevalenza di campioni positivi rispetto alle diverse zone esaminate, allo stadio di sviluppo delle zecche, al periodo di campionamento ed a temperatura e umidità al momento del campionamento. È stato considerato significativo un valore di  $p < 0,05$ .

#### 5.2.4 RICERCA DI *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM*

Gli estratti di DNA da ninfe e adulti sono stati analizzati per la ricerca di *Anaplasma phagocytophilum*. Le larve non sono state utilizzate in quanto non è descritta una trasmissione verticale del patogeno dalla femmina alle uova.

##### 5.2.4.1 REAL-TIME PCR E NESTED-PCR

Un totale di 360 campioni è stato analizzato secondo la metodica Taqman PCR (StepOnePlus, Applied Biosystem, Life Technologies Corporation, Carlsbad, California- USA) per la ricerca del gene *msp2/p44* del batterio in esame (Drazenovich e coll., 2006). La sonda TaqMan (939p-TTA AGG ACA ACA TGC TGT AGC TAT GGA AG-GCA) presenta il “reporter” 6-carbossi-fluoresceina (FAM) all'estremità 5' e il “quencher” 6-carbossi-tetrametil-rodamina (TAMRA) all'estremità 3'. I primer Invitrogen 903f (5'-AGT TTG ACT GGA ACA CAC CTG ATC-3') e 1024r (5'-CTC GTA ACC AAT CTC AAG CTC AAC-3') amplificano un frammento di 122 bp.

I campioni da analizzare sono stati caricati in piastre microtiter contenenti 11 µl di mix, formata da 6 µl di TaqMan Master Mix Fermentas (Fermentas Inc., Glen Burnie, Maryland, USA), 0,6 µl di primer mix + sonda per un totale di 2 nmol di ogni primer e 400 pmol di sonda MWG (High Point, North Carolina, USA), 4,4 µl di acqua e 1 µl di DNA.

Il ciclo di amplificazione era così composto:

- 50°C per 2 minuti
- 95°C per 10 minuti
- 40 cicli di 15 secondi a 95°C
- 60°C per un minuto

Campioni con un valore soglia (Ct-value) inferiore a 40 sono stati considerati positivi.

Sui campioni con Ct-value inferiore a 38 sono state eseguite ulteriori analisi attraverso NESTED-PCR. I geni analizzati sono stati il 23S-5S rRNA (ITS2) e *msp4* (major surface protein 4). Tutte le reazioni di PCR sono state effettuate con un termociclatore Eppendorf Mastercycler ep (Eppendorf AG, Amburgo, Germania).

##### 5.2.4.1.1 23S-5S rRNA

Per quanto riguarda questo gene i primer utilizzati sono: ITS2F (5'- AGG ATC TGA CTC TAG TAC GAG-3') e ITS2R (5'-CTC CCA TGT CTT AAG ACA AAG-3'), come primer esterni e ITS2iF (5'-ATA CCT CTG GTG TAC CAG TTG-3') e ITS2iR (5'-TTA ACT TCC GGG TTC GGA ATG-3') come primer interni (Rejmaenk e coll., 2011).

Il ciclo di amplificazione utilizzato per entrambe le coppie di primer è riportato in tabella 5.2.

La mix utilizzata, di 25 µl di volume, era diversa nelle due PCR ed era così composta:

Mix 1° round:

- |                           |         |
|---------------------------|---------|
| • Green Go Taq Master Mix | 12,5 µl |
| • ITS2-F                  | 2,5 µl  |
| • ITS2-R                  | 2,5 µl  |

- H<sub>2</sub>O 5,0 µl
- DNA 2,5 µl

Mix 2° round:

- Green Go Taq Master Mix 12,5 µl
- ITS2-int F 2,5 µl
- ITS2-int R 2,5 µl
- H<sub>2</sub>O 6,5 µl
- DNA della prima PCR 1,0 µl

La Master mix è prodotta da Promega (Madison, WI, USA), mentre i primer, utilizzati ad una concentrazione di 5 µM sono prodotti Invitrogen (Grand Island, NY, USA).

Fase iniziale	DENATURAZIONE	94°C per 2 minuti
35 Cicli	DENATURAZIONE	94°C per 30 secondi
	ANNEALING	58°C per 30 secondi
	ESTENSIONE	72°C per 1 minuto
Fase finale	ESTENSIONE FINALE	72°C per 4 minuti

Tabella 5.2: Ciclo di amplificazione per il gene 23S-5S rRNA

#### 5.2.4.1.2 Msp4

I primer utilizzati per questo gene sono MSP4P3 (5'- TG AAT TAC AGA GAA TTG CTT GTA GG-3') e MSP4P5 (5'-TTA ATT GAA AGC AAT CTT GCT CCT ATG- 3') come esterni e MSPF1(5'- CTA TTG G(C+T)G G(A+G+C+T)G C(C+T)A GAG T- 3') e MSPR2 (5'-GTT CAT CGA AAA TTC CGT GGT A-3') come interni (de la Fuente e coll., 2005).

La mix è stata preparata secondo le modalità viste per il gene 23S-5S.

Mix 1° round:

- Green Go Taq Master Mix 12,5 µl
- Msp4-Ap5 2,5 µl
- Msp4-Ap 3 2,5 µl
- H<sub>2</sub>O 5,0 µl
- DNA 2,5 µl

Mix 2° round:

- Green Go Taq Master Mix 12,5 µl
- Msp4-F2 2,5 µl
- Msp4-R2 2,5 µl
- H<sub>2</sub>O 6,5 µl
- DNA della prima PCR 1,0 µl

Il ciclo di amplificazione è riportato in tabella 5.3

Fase iniziale	DENATURAZIONE	94°C per 5 minuti
35 Cicli	DENATURAZIONE	94°C per 20 secondi
	ANNEALING	58°C per 20 secondi
	ESTENSIONE	72°C per 50 secondi
Fase finale	ESTENSIONE FINALE	72°C per 5 minuti

Tabella 5.3: Ciclo di amplificazione per il gene msp4

Per valutare l'esito della PCR, gli amplificati di entrambi i geni sono stati caricati su gel di agarosio 1% con GelStar (Lonza, Rockland, ME) e, dopo una corsa di 30 minuti a 110V, sono stati visualizzati al transilluminatore.

Le bande positive sono state separate dal gel utilizzando lame di bisturi sterili e poste in eppendorf da 1,5 ml per effettuare la purificazione.

#### 5.2.4.2 PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI PCR

I campioni risultati positivi sono stati purificati utilizzando il QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) secondo il seguente protocollo:

- ❖ Scioglimento del gel di agarosio: in ogni provetta contenente i frammenti di gel sono stati aggiunti 3 volumi del buffer QG su un volume di gel in base al peso del frammento stesso (100 mg ~ 100 µl). I campioni sono stati quindi incubati a 50°C per 10 minuti vortexando ogni 2-3 minuti per favorire lo scioglimento
- ❖ Allestimento delle colonnine: per ogni campione è stata posizionata una colonnina a membrana silicea su un tubo da 2 ml
- ❖ Legame del DNA: i campioni sono stati trasferiti nelle colonnine e centrifugati per 1 minuto a 11.000 x g. In ogni colonnina possono essere caricati al massimo 800 µl, quindi in caso di volumi superiori il campione è stato caricato in due volte e centrifugato nuovamente. Il liquido raccolto nel tubo è stato buttato e il tubo stesso riutilizzato per i passaggi successivi.
- ❖ Rimozione dell'agarosio: per eliminare eventuali tracce di gel, sono stati aggiunti 500 µl di buffer QG ad ogni campione e centrifugato nuovamente per 1 minuto a 11.000 x g. Anche in questo caso il materiale raccolto nel tubo è stato gettato e il tubo riutilizzato.
- ❖ Lavaggio della membrana di silice: ad ogni colonnina sono stati aggiunti 750 µl di buffer PE, i campioni sono stati incubati 2-5 minuti a temperatura ambiente e successivamente centrifugati a 11.000 x g per un minuto. Il tubo è stato svuotato e riutilizzato.
- ❖ Asciugatura della membrana: dopo aver svuotato il tubo, la colonnina è stata sottoposta ad un'ulteriore centrifugazione a velocità massima, 17.000 x g, per asciugare la membrana ed eliminare i residui di etanolo contenuti nel buffer PE.
- ❖ Eluizione del DNA: dopo l'asciugatura le colonnine sono state poste in eppendorf da 1,5 ml pulite e sono stati aggiunti 50 µl di acqua sterile preriscaldata a 50°C. I campioni sono stati quindi centrifugati nuovamente e il DNA purificato è stato conservato a -20°C in attesa di inviarlo al sequenziamento.



Di ogni campione da sequenziare sono stati inviati 15 µl di DNA purificato; in una provetta a parte sono stati preparati 15 µl di primer Forward per campione, alla stessa concentrazione utilizzata nella PCR. I campioni sono stati sequenziati da Davis Sequencing (Davis, Ca), che utilizza un sequenziatore ABI 3730.

#### 5.2.4.3 ANALISI FILOGENETICA

Le sequenze sono state visualizzate e corrette utilizzando il programma BioEdit v 7.0.9, sono state tagliate ad una lunghezza finale di 248 bp per il gene ITS2 e 331 bp per msp4. Le sequenze ottenute sono quindi state confrontate con BLAST (Altschul e coll., 1990) con quelle presenti in GenBank.

Per entrambi i geni le analisi filogenetiche sono state condotte utilizzando il programma Mega 5 secondo il metodo Maximum Likelihood, Kimura 2-parametri con 1000 ripetizioni bootstrap.

#### 5.2.4.4 ANALISI STATISTICA

Come nel caso dei piroplasmii, è stato utilizzato il test del  $\chi^2$  per confrontare i livelli di prevalenza tra ninfe e adulti, e, per quanto riguarda le zecche ambientali, le differenze tra i siti campionati, tra le temperature e i livelli umidità relativa misurate a 5 cm dal suolo e il mese di raccolta. È stato considerato significativo un valore di  $p < 0.05$ .

#### 5.2.5 RICERCA DI *BORRELIA BURGDORFERI* S.L.

I 360 campioni analizzati per *A. phagocytophilum* sono stati sottoposti anche a indagini molecolari per la ricerca di *B. burgdorferi* s.l. con l'intenzione di identificare le differenti genospecie nei campioni risultati positivi attraverso la metodica RFLP.

##### 5.2.5.1 REAL-TIME PCR

Su tutti i campioni è stata eseguita la real-time PCR, utilizzando la metodica Taqman per l'analisi della regione 16S rDNA secondo il protocollo di Barbour e coll. (2009) modificato.

Sono stati utilizzati i primers BorrF (5'–GCT GTA AAC GAT GCA CAC TTG GT–3') e Borr R (5'–GGC GGC ACA CTT AAC ACG TTA G–3') e la sonda 6FAM (TTC GGT ACTA ACT TTT AGT TAA) commercializzata da Applied Biosystem. La reazione è stata condotta in un volume di 12 µl contenenti 6 µl di TaqMan Master Mix (Fermentas), 0,6 µl di primer mix/sonda per un totale di 2 nmol di ogni primer e 400 pmol di sonda MWG (High Point, NC, USA), 4,4 µl di acqua e 1 µl di DNA.

Il ciclo di amplificazione prevedeva:

- 50°C per 2 minuti
- 95°C per 10 minuti
- 50 cicli di 15 secondi a 95°C (il protocollo originale prevedeva 45 cicli)
- 60°C per 1 minuto (il protocollo originale prevedeva una temperatura di 63°C)

Anche per questa specie, i campioni che presentavano un Ct-value  $< 40$  sono stati considerati positivi e quelli con valore minore o uguale a 38 sono stati processati con la tecnica RFLP.

### 5.2.5.2 PCR-RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)

La metodica PCR-RFLP permette, attraverso l'impiego di enzimi di restrizione, di ottenere frammenti del DNA di un determinato gene amplificato con la PCR. I frammenti, nel caso del complesso *B.burgdorferi* s.l., si differenziano in base alla genospecie di pertinenza e si presentano di dimensioni, e quindi pesi molecolari, diversi. La visualizzazione su gel permette quindi di individuare queste differenze e di discriminare una specie dall'altra.

Per i campioni in esame è stato scelto di effettuare una PCR per il gene 23S-5S rRNA e successivamente utilizzare gli enzimi MseI e DraI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) per individuare i pattern di restrizione. La scelta degli enzimi è stata effettuata dopo un'accurata ricerca bibliografica e sulla base dei risultati prodotti da Lin e coll. (2001) e Chu e coll. (2011).

La mix di PCR utilizzata, per un totale di 25 µl, era composta da:

- Green Go Taq Master Mix    12,5 µl
- Primer F                        2,5 µl
- Primer R                        2,5 µl
- H<sub>2</sub>O                              5,0 µl
- DNA                              2,5 µl

I primer utilizzati sono stati rrf-rrl F (5'-CTG CGA GTT CGC GGG AGA-3') e rrf-rrl R (5'-TCC TAG GCA TTC ACC ATA-3') (Postic e coll., 1994) che amplificano un frammento di circa 250bp. Come per le altre PCR la Green Go Taq è di Promega e i primer, utilizzati sempre a 5 µM, sono prodotti da Invitrogen.

Il ciclo di amplificazione utilizzato è riportato in tabella 5.4.

Fase iniziale	DENATURAZIONE	94°C per 1 minuto
30 Cicli	DENATURAZIONE	94°C per 1 minuto
	ANNEALING	52°C per 1 minuto
	ESTENSIONE	72°C per 2 minuti
Fase finale	ESTENSIONE FINALE	72°C per 5 minuti

Tabella 5.4: Protocollo di amplificazione del gene 23S-5S rRNA di *B. burgdorferi* s.l.

Dopo diverse prove utilizzando concentrazioni diverse di enzimi e tempi di incubazione diversi sono state raggiunte le condizioni ideali per ottenere un'adeguata separazione dei frammenti di DNA.

La mix di reazione per l'enzima MseI era costituita da:

- Buffer                        4 µl
- Enzima                      0,8 µl
- BSA                         0,2 µl
- H<sub>2</sub>O                        7,2 µl
- DNA                        10 µl
- 

I campioni venivano preparati in piastre da microtiter e posti ad incubare a 37°C per un'ora.

La mix per l'enzima Dral era invece costituita da:

- Buffer 4 µl
- Enzima 2 µl
- H<sub>2</sub>O 6 µl
- DNA 10 µl

In questo caso i campioni, dopo la preparazione, venivano lasciati incubare per 2 ore sempre a 37°C per ottenere una migliore separazione dei frammenti.

Terminata l'incubazione i campioni sono stati caricati su gel di agarosio al 3% con GelStar per 3 ore a 100 V, utilizzando il marker "All Purpose Lo DNA marker" (Bionexus, Oakland, California, USA).

I gel sono quindi stati osservati al transilluminatore per individuare le bande ottenute.

Una volta identificati i diversi pattern polimorfici, per identificare le genospecie correlate è stata eseguita un'ulteriore PCR per lo stesso gene 23S-5S rRNA. I prodotti di PCR sono stati quindi purificati e inviati al servizio di sequenziamento, secondo le modalità descritte per *A. phagocytophilum*.

In caso di esito sfavorevole del sequenziamento, è stata effettuata l'amplificazione del gene della flagellina (FlaB) secondo la metodica descritta da Barbour e coll. (1996). È stata eseguita una NESTED-PCR con le seguenti coppie di primers, che portano ad un amplificato di circa 320bp:

esterni:

- FlaLL (5'-ACA TAT TCA GAT GCA GAC AGA GGT-3')
- FlaRL (5'-GCA ATC ATA GCC ATT GCA GAT TGT-3')

con la seguente mix di reazione (25 µl di volume):

- Green Go Taq 12,5 µl
- Primer F 2,5 µl
- Primer R 2,5 µl
- H<sub>2</sub>O 5,0 µl
- DNA 2,5 µl

interni:

- FlaLS (5'-AAC AGC TGA AGA GCT TGG AAT G-3')
- FlaRS (5'-CTT TGA TCA CTT ATC ATT CTA ATA GC-3')

con questa mix (25 µl di volume):

- Green Go Taq 12,5 µl
- Primer F 2,5 µl
- Primer R 2,5 µl
- H<sub>2</sub>O 5,0 µl
- DNA della prima PCR 1,0 µl

Anche in questo caso la Green Go Taq è di marca Promega e i primer Invitrogen, utilizzati sempre a 5 µM.

Come già visto in precedenza, i campioni amplificati sono stati caricati su gel all'1% di agarosio con GelStar e fatti correre per 30 minuti a 110V. Terminata la corsa il gel

è stato osservato al transilluminatore e le bande di DNA sono state separate dal gel e preparate per la purificazione, secondo il protocollo Qiagen già descritto.

I campioni purificati sono quindi stati inviati al servizio di sequenziamento, con le stesse modalità viste in precedenza per *A. phagocytophilum*.

Le sequenze ottenute sono state analizzate con BLAST (Altschul e coll., 1990) per identificare le specie di appartenenza.

#### 5.2.5.3 ANALISI STATISTICA

Come nel caso dei piroplasmi e di *A. phagocytophilum*, è stato utilizzato il test del  $\chi^2$  per confrontare i livelli di prevalenza tra ninfe e adulti e, per quanto riguarda le zecche raccolte dall'ambiente, le differenze tra i siti di campionamento, le temperature e i livelli di umidità relativa registrate a 5 cm dal suolo e il mese di campionamento. È stato considerato significativo un valore di  $p < 0.05$ .

# 6

# RISULTATI

## 6.1 CAMPIONAMENTO DI ZECCHÉ

Nel periodo Aprile-Ottobre 2010, sono state raccolte dall'ambiente complessivamente 8139 zecche nelle 4 località esaminate. In particolare il numero più elevato è stato riscontrato in località Ciagnano (4187) seguito da Cà de Mandorli (2123), Parco del Carnè (967) e infine Monteveglio (862). In maggioranza si trattava di larve (6734) e in misura minore di ninfe (1344). Sono invece stati raccolti solo pochi esemplari adulti (28 femmine e 33 maschi).

Nello stesso periodo, su animali e uomo sono state raccolte 73 zecche: di cui 33 femmine, 35 maschi e 5 ninfe.

Di seguito sono descritte le diverse specie reperite con le caratteristiche morfologiche distintive che hanno permesso l'identificazione secondo le chiavi di Manilla (1998) e Iori (2005).

Larva di *Ixodes ricinus*: (Fig. 6.1)

- Dimensioni 0,8 mm circa
- Capitulum con base triangolare
- Cornua piccole a punta arrotondata
- Auriculae rettangolari a punte smusse
- Coxae I con spina esterna corta ed interna più allungata
- Coxae II-III con modeste spine esterne
- Ipostoma con apice arrotondato con 7 file basali 2/2 e 3-4 file subapicali 3/3



Figura 6.1: Larva di *I. ricinus*, veduta ventrale

Ninfa di *I. ricinus*: (Fig. 6.2)

- Dimensioni 1,5 mm x 0,7 mm
- Assenza di apertura genitale e aree porose
- Auricole ad angolo retto
- Aspetto simile alla femmina



Figura 6.2a,b: Ninfa di *I. ricinus* veduta dorsale e ventrale

Maschio di *I. ricinus*: (Fig. 6.3)

- Dimensioni 2,2-2,6 mm x 1,4 mm

- Cornua assenti
- Stigmata grandi quanto le coxae IV
- Scudo mediano ventrale con margini laterali arrotondati alla base
- Scudi adanali con margini laterali convergenti posteriormente
- Scudo dorsale con setae rade e corte
- Tarsi II-IV gradualmente assottigliati
- Capitulum con base dorsalmente larga quanto lunga
- Coxa I con spina interna molto lunga che sopravanza il margine anteriore della coxa



II Figura 6.3a,b: Maschio di *I. ricinus*, veduta dorsale e veduta ventrale (porzione rostrale e anale).

Femmina di *I. ricinus*: (Fig. 6.4)

- Cornua assenti
- Auriculae assenti
- Ipostoma dentellato con 4-5 file sub apicali 4/4 e 5 file basali 2/2 fra cui sono interposte 5 file 3/3
- Solchi scapolari superficiali
- Idiosoma con setae corte e rade
- Coxa I con lunga spina interna dritta
- Tarsi gradualmente assottigliati fino all'inserzione dei pulvilli.



Figura 6.4a,b: Femmina di *I. ricinus*, veduta dorsale e ventrale

Maschio di *I. acuminatus*:

- Corpo ovale lungo 1,5 mm circa
- Scudo oblungo con solchi cervicali poco marcati, rettilinei, divergenti; scapule alte
- Setae rade, corte e incolore
- Scudi adanali a rettangoli curvilinei con margini sub paralleli
- Scudo anale ogivale
- Palpi corti e larghi
- Ipostoma con apice appiattito e incavato medialmente con denti larghi laterali uniti da 6-7 file sinuose di dentelli rudimentali
- Coxa I con spina interna lunga che si sovrappone alla coxa II e spina esterna più piccola e arrotondata
- Coxae II-III con spine larghe e smussate, di cui quelle esterne sono più evidenti delle interne
- Coxa IV solo con piccola spina esterna
- Tarsi gradualmente assottigliati

Femmina di *I. acuminatus*: (Fig. 6.5)

- Idiosoma con setae lunghe
- Solchi scapolari rilevati come creste
- Cornua corte, triangolari, retroverse, appuntite
- Auricole piatte, triangolari, retroverse
- Ipostoma affusolato con 3-4 file basali 2/2 e 10-11 file subapicali 3/3
- Coxa I con spina interna lunga, affilata, diritta, che sorpassa il margine anteriore della coxa II
- Coxae II-III con corte spine interne
- Tarsi gradualmente assottigliati



Figura 6.5a,b,c: Femmina di *I. acuminatus*, veduta ventrale, dorsale e capitulum

Larva di *Scaphixodes frontalis*: (Fig. 6.5)

- Dimensioni 0,9 mm di lunghezza, 0,6 mm di larghezza nel terzo posteriore.
- Capitulum con base dorsale più larga che lunga
- Cornua sottili
- Palpi con articoli fusi tra loro



- Auriculae a punte smusse e che non sporgono dai margini laterali della base
- Ipostoma affusolato con 4 file basali 2/2 e 3-5 file subapicali 3/3
- Coxae I con spina interna più lunga dell'esterna
- Coxae II-III con sole spine esterne, piccole e appuntite.



Figura 6.6: Larva di *S. frontalis*, veduta ventrale

Ninfa di *S. frontalis*: (Fig. 6.7)

- Dimensioni 1 mm x 0,85 mm
- Scudo stretto, glossiforme, più lungo che largo, con lunghe setae evidenti soprattutto nell'area centrale.
- Solco anale arcuato con branche leggermente convergenti che raggiungono il margine posteriore
- Assenza di apertura genitale
- Auricole sporgono dai margini laterali della faccia ventrale della base con escrescente triangolari smussate
- Ipostoma lungo e fusiforme con 6 file basale 2/2 , 2-3 file 3/3 e 1-2 file 4/4



Figura 6.7a,b: Ninfa di *S. frontalis*, veduta ventrale e rostro

Femmina di *S. frontalis*: (Fig. 6.8)

- Corpo ovale dalle dimensioni da 3 a 11 mm circa

- Apertura genitale a livello delle coxa III
- Solco anale molto corto
- Stigmata ovali, grandi e larghe
- Capitulum con base dorsalmente rettangolare, due volte più larga che lunga
- Cornua minute
- Auriculae come grosse escrescenze rettangolari dirette e sporgenti lateralmente oltre i margini ventrali della base
- Ipostoma lungo e fusiforme, con estremità appuntita e dentellato con 3 file basali 2/2, 3 file 3/3 e 7-8 file sub apicali 4/4
- Coxa I con spina interna stretta che raggiunge la coxa II
- Coxa I-IV con robusti speroni esterni
- Tarsi gradualmente assottigliati.



Figura 6.8a,b: Femmina di *S. frontalis*, veduta ventrale e dorsale

Maschio di *Hyalomma m. marginatum*: (Fig. 6.9)

- Dimensioni 4-6 mm x 3-3,5 mm
- Scudo dorsale da rosso a bruno marrone, con scapule alte e punteggiature numerose di varia grandezza, solchi laterali lunghi fino alla metà dello scudo
- Cornua appena accennate
- Stigmata rotondeggianti
- Festoni non chiusi e parma assente
- Solchi paramediani difficilmente apprezzabili
- Apertura genitale tra le coxae I e II
- Scudi adanali subrettangolari, lunghi con margini posteriori nettamente più corti dei margini interni
- Stigmata con coda lunga e tozza, leggermente arcuata
- Capitulum con la base a margine posteriore dorsale concavo e margini laterali leggermente divergenti anteriormente, con aree porose ovali e ravvicinate
- Ipostoma lungo con estremità arrotondata e dentizione 3/3
- Palpi lunghi e dritti con articolo I ventralmente prolungato come appendice spiniforme
- Coxa I con spina bifida tipica del genere
- Coxae II-IV con corte e larghe spine esterne
- Articoli successivi rosso-bruni con anelli bianco giallastri



Figura 6.9a,b,c,d: Maschio di *H. m. marginatum*, veduta dorsale, ventrale, particolari di stigmi respiratori e rostro

Femmina di *H. m. marginatum*: (Fig 6.10)

- Corpo di notevoli dimensioni da 6 a 18 mm circa
- Scudo dorsale più largo che lungo, con scapule molto alte e larghe
- Apertura genitale a livello delle coxa II
- Stigmata grandi e ovali con brevi appendici caudali ricurve e appuntite, con area peristigmata glabra
- Capitulum con la base a margine posteriore dorsale concavo e margini laterali leggermente divergenti anteriormente, con aree porose ovali e ravvicinate
- Ipostoma lungo con estremità arrotondata e dentizione 3/3
- Palpi lunghi e dritti con articolo I ventralmente prolungato come appendice spiniforme
- Coxa I con spina bifida tipica del genere
- Coxae II-IV con corte e larghe spine esterne
- Articoli successivi rosso-bruni con anelli bianco giallastri



Figura 6.10a,b,c,d: Femmina di *H. m. marginatum* veduta dorsale, ventrale, stigma e rostro

Maschio di *Hyalomma detritum detritum*: (Fig 6.11)

- Dimensioni 4,5-5,5 mm x 2,8-3,2 mm
- Capitulum con base dorsalmente subrettangolare
- Palpi lunghi con articoli I ventralmente romboidale con angolo posteriore spiniforme
- Scudo dorsale liscio, lucido, con minute punteggiature superficiali
- Solchi laterali lunghissimi estesi dai festoni agli occhi
- Solco posteriomediano esteso dal parma a circa metà dello scudo
- Parma grosso, sub triangolare, spesso giallastro
- Apertura genitale tra coxae I e II
- Scudi adanali lunghi e stretti
- Scudi subanali semilunari piccoli
- Stigmata con code lunghe, appuntite distalmente e inarcate dorsalmente
- Arti uniformemente pigmentati in giallo-bruno, privi di anelli o chiazze scolorate, talora sono presenti deboli strie dorsali





Figura 6.11: Maschio di *H. d. detritum*, veduta ventrale e stigma

Maschio di *H. detritum scupense*, simile a quello di *H. d. detritum*, si differenzia per: (Fig. 6.12)

- Dimensioni inferiori 3,2-3,8 mm x 2,0-2,4 mm
- Stigmata con code corte, tozze e solo leggermente incurvate

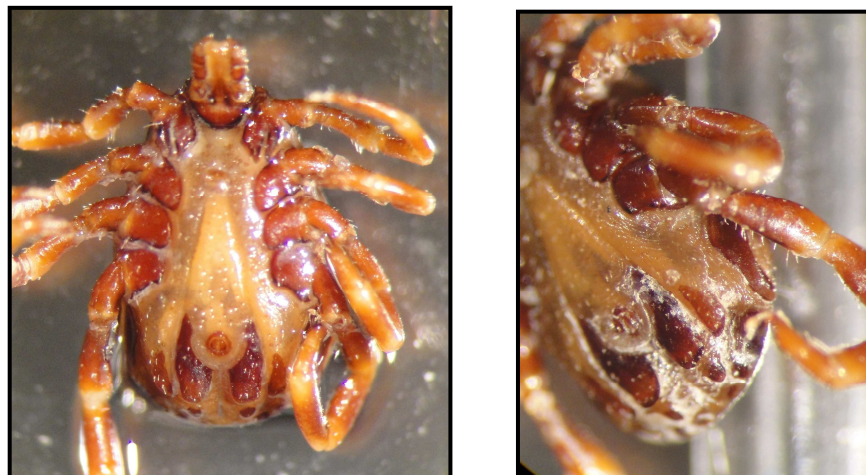


Figura 6.12: Maschio di *H. d. scupense*, veduta dorsale e stigma

Larva di *Hyalomma* spp. (Fig. 6.11)

Gli stadi immaturi del genere *Hyalomma* non consentono l'identificazione di specie. In generale nel genere *Hyalomma* le larve sono caratterizzate da:

- Palpi lunghi ancora privi di strutture di aggancio
- Ipostoma con estremità arrotondata armato di file 2/2
- Presenza di occhi sporgenti alla confluenza dei margini anteriori con quelli posteriori dello scudo
- Festoni presenti
- Coxae inermi



Figura 6.11: Larva di *Hyalomma* spp.

Femmina di *Dermacentor marginatus*: (Fig. 6.13)

- Scudo dorsale rotondeggiante smaltato con macchie brunastre
- Capitulum con base rettangolare
- Cornua piccole e smusse
- Aree porose ovoidali
- Palpi diritti con articolo I molto ridotto
- Ipostoma corto e robusto con minuta corona e 8 file di grossi denti 3/3
- Solchi genitali che divergono posteriormente alle coxae IV
- Stigmata larghi, ovoidali e rilevati
- Coxa I fessurata in due spine
- Coxae II-IV con spine esterne larghe e lunghe
- Tarsi con uncini ventrali pre-apicali



Figura 6.13a,b: Femmina di *D. marginatus*, veduta dorsale e ventrale

Larva di *D. marginatus*: (Fig 6.12)

- Corpo largo e ovale poco più di 0,6 mm largo 0,5 mm
- Scudo dorsale più lungo che largo con margine posteriore solo leggermente arrotondato, quasi piatto che non supera metà dell'idiosoma
- Capitulum con base dorsale a margini postero-laterali prolungati che formano angoli molto acuti spiniformi con quelli antero-laterali

- Palpi a margini convessi con estremità a punte smussate e senza apparente sutura fra gli articoli I e II
- Ipostoma corto, piatto apicalmente con 6-7 file di denti 2/2
- Coxa I con piccola spina interna
- Coxa II-III con spine esterne che debordano dai margini posteriori.



Figura 6.12: Larva di *D. marginatus*

Femmina di *Rhipicephalus turanicus*: (Fig. 6.14)

- Dimensioni 3,5 mm x 2 mm
- Capitulum con base esagonale più larga che lunga
- Cornua corte a larghi triangoli arrotondati
- Palpi con estremità quasi piatte, margini esterni dritti e interni leggermente convessi
- Articolo I e II con margini ventrali muniti di setae e sutura evidente fra articoli III e IV
- Ipostoma corto con estremità arrotondata e dentizione 3/3
- Scudo dorsale più lungo che largo
- Solchi cervicali profondi, arcuati, più larghi anteriormente con grosse punteggiature
- Occhi grandi appiattiti
- Alloscutum con solchi marginali superficiali estesi e 11 festoni
- Faccia ventrale con setae
- Apertura genitale fra le coxae II a forma di U larga
- Coxa I profondamente bifida
- Coxae II-IV con spine esterne corte e robuste
- Tarso IV con due uncini ventrali, uno preapicale e uno apicale



Figura 6.14a,b: Femmina di *R. turanicus*, veduta ventrale e dorsale

Maschio di *R. turanicus*: (Fig. 6.15)

- Dimensioni 4 mm x 2 mm
- Capitulum con base esagonale più lunga che larga
- Cornua robuste discretamente lunghe e arrotondate
- Palpi come nella femmina ma più corti e tozzi
- Ipostoma con dentizione 3/3
- Scudo dorsale con punteggiature di varie dimensioni, solchi laterali profondi e solchi cervicali poco profondi; solco mediano corto e largo
- Occhi appiattiti
- Faccia ventrale con setae
- Apertura genitale tra le coxae I e II
- Stigmata con code corte, tozze e larghe quanto un festone
- Arti come nella femmina



Figura 6.15a,b: Maschio di *R. turanicus*, veduta ventrale e stigma



Femmina di *R. sanguineus*: (foto assente)

- Dimensioni 3,5 mm x 1,5 mm (11 mm x 7 mm se ingorgata)
- Capitulum a base esagonale con margine postero-dorsale leggermente concavo
- Cornua piccole subtriangolari a punta arrotondate
- Palpi corti con estremità a tondo appiattito e articolo I ben evidente munito di spina robusta
- Scudo dorsale più lungo che largo con solchi cervicali lunghi arcuati e profondi, con rade punteggiature
- Occhi appiattiti
- Alloscutum con margini posterolaterali orlati e 11 festoni
- Faccia ventrale con setae dense
- Apertura genitale a livello delle coxae II
- Arti come in *R. turanicus*

Maschio di *R. sanguineus*: (Fig 6.16)

- Dimensioni 3 mm x 1,5 mm
- Capitulum a base esagonale simile a quello della femmina ma con palpi più tozzi e appiattiti
- Scudo dorsale con grosse punteggiature
- Margini posterolaterali con 11 festoni
- Solchi laterali dai festoni agli occhi e breve solco longitudinale mediano
- Faccia ventrale con rade e corte setae
- Apertura genitale fra coxae I e II
- Scudi adanali con margini posteriori quasi rettilinei, angoli interni posteriori retti
- Scudi accessori lunghi con estremità appuntite
- Stigmata con lunga coda arcuata e stretta, non più larga della metà di un festone



Figura 6.16a,b: Maschio di *R. sanguineus*, veduta ventrale e stigma

Femmina di *R. bursa*: (foto assente)

- Dimensioni 4 mm x 2 mm

- Capitulum con base esagonale più larga che lunga
- Cornua corte, appuntite, subtriangolari
- Palpi corti con apice quasi piatto
- Articolo I dei palpi ventralmente munito di una robusta spina
- Articolo II dei palpi con piccola spina dorsomediale
- Ipostoma con estremità rotondeggiante con 7-8 file di denti 3/3
- Scudo dorsale lungo quanto largo
- Solchi cervicali profondi anteriormente, larghi posteriormente ed estesi fino ai margini
- Alloscutum ricco di punteggiature con 11 festoni
- Apertura genitale tra coxae II a V
- Stigmata a largo ovale con breve processo caudale
- Coxa I profondamente bifida
- Coxae II-IV con spine corte e robuste
- Tarso IV con uncino preapicale ventrale

Maschio di *R. bursa*: (Fig 6.17)

- Dimensioni 4 mm x 2,5 mm
- Capitulum con base a esagono stretto
- Cornua robuste, pronunciate e a punte smussate
- Palpi simili a quelli della femmina, più tozzi e con apici appiattiti
- Ipostoma cilindrico con estremità arrotondate e 6-7 file di denti 3/3
- Scudo dorsale bruno, densamente punteggiato
- Solchi laterali estesi dagli occhi ai festoni, solco longitudinale posteromediano lungo e stretto
- Margini posterolaterali orlati con 11 festoni
- Apertura genitale a livello del margine anteriore delle coxae II
- Scudi adanali più lunghi che larghi, stretti anteriormente, con margini laterali convessi e molto divergenti
- Arti come nella femmina



Figura 6.17a,b,c: Maschio di *R. bursa*, veduta dorsale, ventrale e rostro

### 6.1.1 “QUESTING TICKS”

La specie predominante è risultata essere *I. ricinus*. Raramente sono state riscontrate anche *Scaphixodes frontalis*, *Hyalomma* spp., *D. marginatus*.

Nello specifico il numero degli esemplari raccolti è stato:

- *I. ricinus*: 8080 esemplari;
- *D. marginatus*: 37 esemplari;
- *S. frontalis*: 13 esemplari;
- *Hyalomma* spp.: 6 esemplari;
- *I. acuminatus*: 3 esemplari.

In tabella 6.1 sono riassunte le specie ritrovate divise per zone di campionamento e per stadio di sviluppo.

SPECIE	STADIO	Ca' De Mandorli	Ciagnano	Monteveglia	Parco del Carnè	TOTALE
<b><i>Ixodes ricinus</i></b>	Larve	1876	3614	520	684	6694
	Ninfe	242	493	330	268	1333
	Femmine	2	11	6	3	22
	Maschi	2	16	6	7	31
<b><i>Scafixodes frontalis</i></b>	Larve				1	1
	Ninfe		9		2	11
	Femmine				1	1
	Maschi					
<b><i>Dermacentor marginatus</i></b>	Larve		36			36
	Ninfe					
	Femmine	1				1
	Maschi					
<b><i>Hyalomma</i> spp.</b>	Larve		3			3
	Ninfe					
<b><i>Hyalomma</i> m. <i>marginatum</i></b>	Femmine		2			2
	Maschi		1			1
<b><i>Ixodes acuminatus</i></b>	Larve					
	Ninfe					
	Femmine		2			2
	Maschi				1	1
Totale		2123	4187	862	967	8139

Tabella 6.1: Numero totale di zecche, divise per stadio di sviluppo, raccolte dall'ambiente nelle diverse aree di campionamento .

Come si può notare la maggiore eterogenicità di specie è stata rilevata a Ciagnano.

Poiché le specie diverse da *I. ricinus* sono state riscontrate in minor numero e solo occasionalmente, per le considerazioni seguenti è stata presa in esame solo questa specie.

### 6.1.2 ANALISI DELL'ABBONDANZA DI *I. RICINUS*

L'abbondanza media di *I. ricinus* sul totale delle aree campionate, per l'intero periodo di cattura, è risultata pari a 106,3/100 m<sup>2</sup>; più in dettaglio si è evidenziata una maggior abbondanza relativa media dello stadio larvale (87,5/100 m<sup>2</sup>) rispetto alle ninfe (18/100 m<sup>2</sup>) e soprattutto agli adulti (0,6/100 m<sup>2</sup>). Valutando i diversi siti di campionamento si può evidenziare come sia per le zecche in totale, sia considerando solo le larve o le ninfe, a Ciagnano si sia registrato un indice di abbondanza medio significativamente più elevato ( $p < 0,01$  per il totale delle zecche e per le larve,  $p < 0,05$  per le ninfe) rispetto agli altri siti, mediante confronto con il Test di Kruskal-Wallis (Tab. 6.2).

LOCALITA'		Zecche/100 m <sup>2</sup>	Larve/100 m <sup>2</sup>	Ninfe/100 m <sup>2</sup>	Adulti/100 m <sup>2</sup>
<b>Cà de Mandorli</b>	Media	147,2279	124,1241	22,7806	0,32313
	N	28	28	28	28
	Deviaz. standard	271,48028	278,81159	37,12279	0,837955
<b>Carnè</b>	Media	44,6311	33,3402	10,8988	0,39206
	N	33	33	33	33
	Deviaz. standard	59,38407	57,37237	25,69506	1,232416
<b>Ciagnano</b>	Media	246,0714	215,1190	29,3452	1,60714
	N	28	28	28	28
	Deviaz. standard	333,88387	345,43315	38,34632	2,702009
<b>Monteveglia</b>	Media	34,2063	20,6349	13,0952	0,47619
	N	42	42	42	42
	Deviaz. standard	35,91476	28,83688	21,08690	0,922888
<b>Total</b>	Media	106,2738	87,5244	18,0854	0,66401
	N	131	131	131	131
	Deviaz. standard	216,67592	219,05750	30,78293	1,597323

Tabella 6.2: Indice di abbondanza dei vari stati di sviluppo nei diversi siti di campionamento (N= numero totale di campionamenti per area)

Considerando i diversi mesi di raccolta, complessivamente si può notare (Grafico 6.1) come nel mese di luglio si sia registrata la massima abbondanza di zecche. Un altro picco di raccolta, anche se molto inferiore, si è osservato nel mese di maggio.

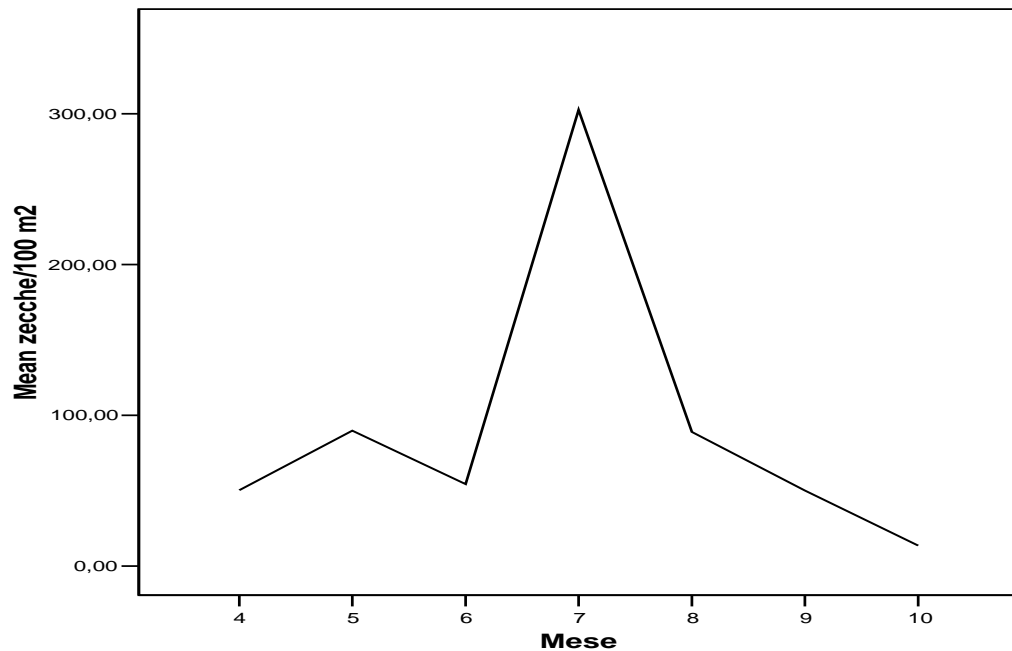


Grafico 6.1: Numero totale di zecche nel tempo

Sono state evidenziate alcune differenze a seconda delle diverse zone di campionamento e dello stadio di sviluppo delle zecche (Grafici 6.2-6.5).

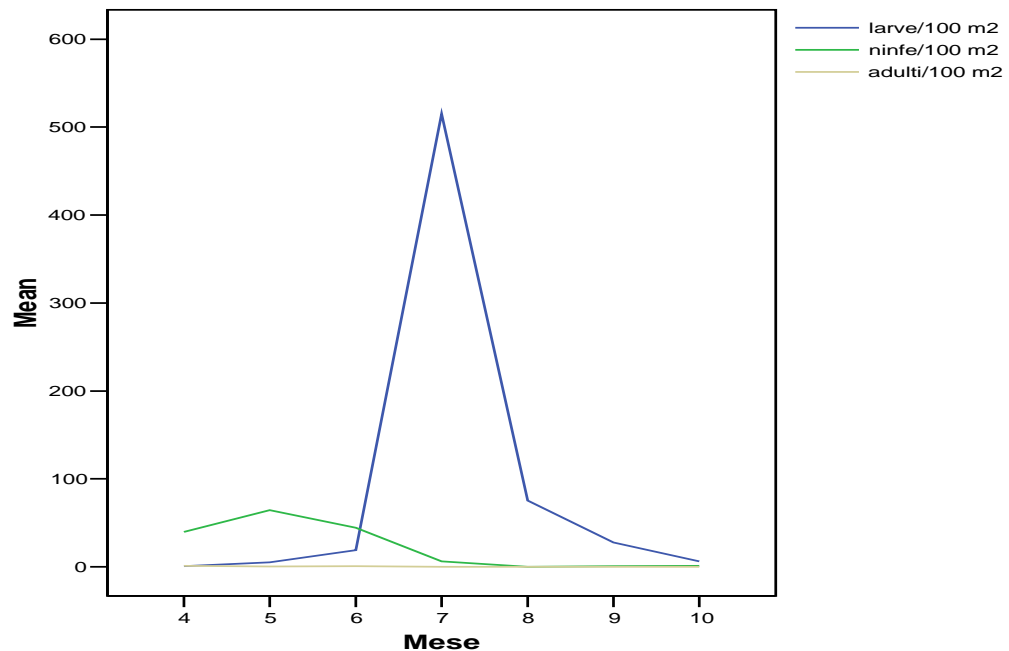


Grafico 6.2: IAL, IAN, IAA nei diversi mesi di campionamento a Cà de Mandorli.

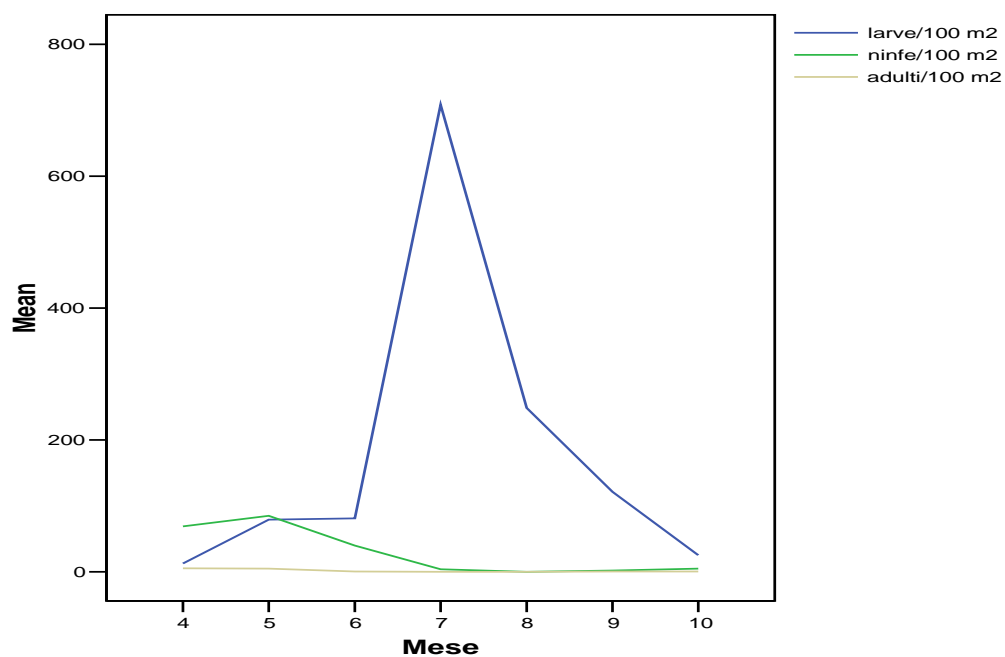


Grafico 6.3: IAL, IAN, IAA nei diversi mesi di campionamento a Ciagnano.

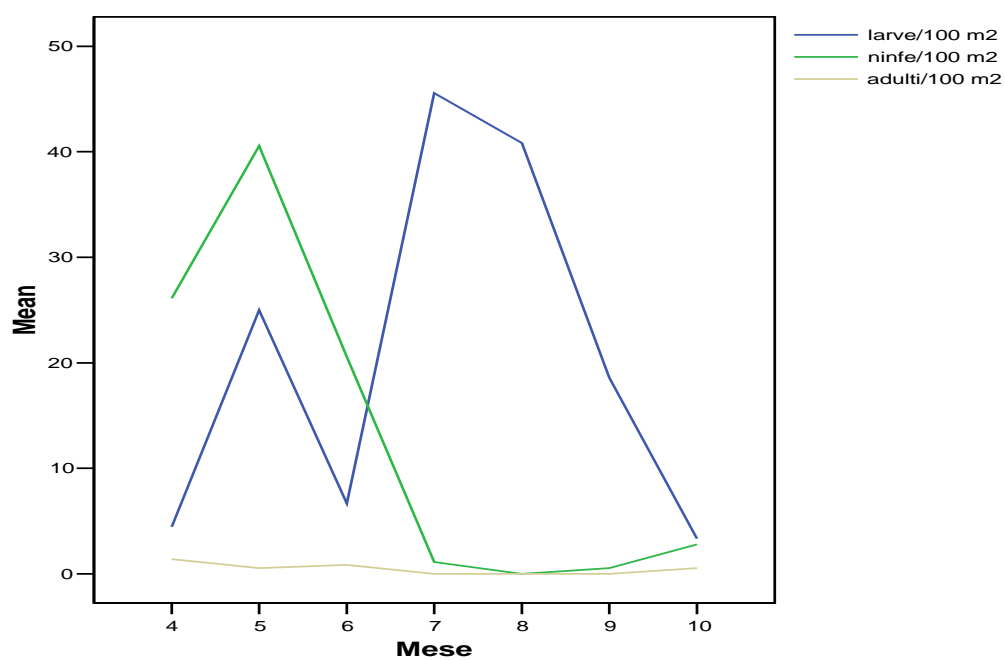


Grafico 6.4: IAL, IAN, IAA nei diversi mesi di campionamento a Monteveglio.

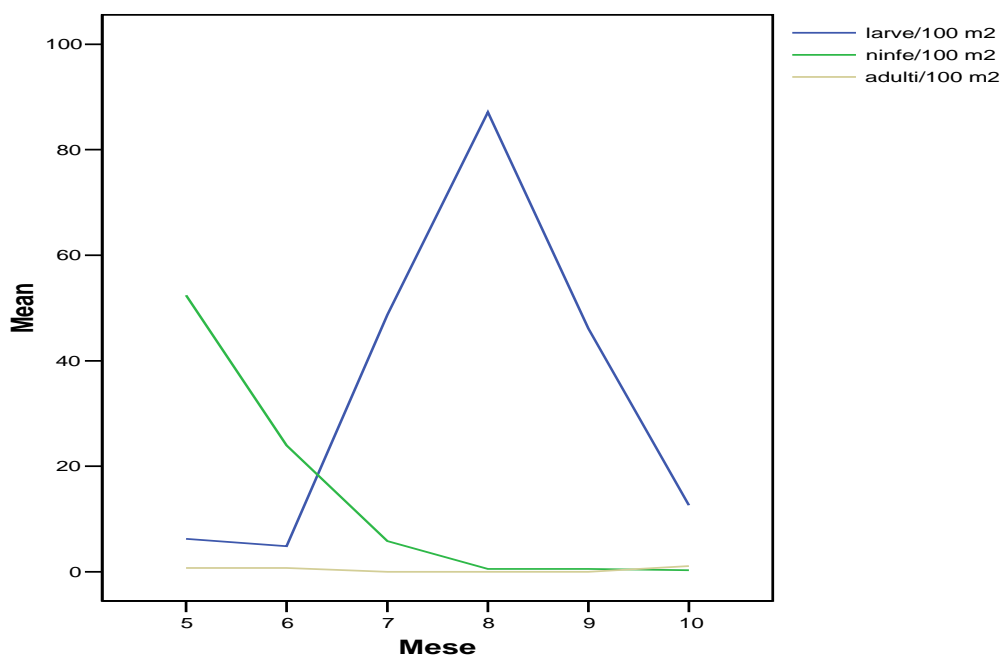


Grafico 6.5: IAL, IAN, IAA nei diversi mesi di campionamento a Carnè.

Come si può osservare dai grafici, per quanto riguarda le larve, il maggior indice di abbondanza è stato riscontrato nel mese di luglio nei due siti di raccolta del Parco dei Gessi, ovvero a Cà de Mandorli e Ciagnano, (Grafico 6.2 e 6.3) e a Monteveglio (Grafico 6.4), anche se in quest'ultimo sito è evidente un precedente picco, di entità inferiore, nel mese di maggio. Per quanto riguarda il Parco del Carnè (Grafico 6.5) il maggior IAL è stato osservato nei campionamenti del mese di agosto.

Il maggior indice di abbondanza per le ninfe è stato riscontrato nel mese di maggio in tutte le aree di campionamento, precedendo così il picco delle larve, anche se a Monteveglio, in corrispondenza del picco delle ninfe in maggio, è presente anche un aumento di abbondanza delle larve.

Il riscontro di soggetti adulti è risultato invece piuttosto sporadico e distribuito durante tutto l'arco dei campionamenti.

Da dati rilevati presso le centraline dell'ARPA, situate in zone vicine alle aree di campionamento, è stato evidenziato come i parametri del "macroclima", inteso come Temperatura Media dell'aria a 2 m (in Gradi Centigradi) e l'Umidità Relativa Media (Percentuale), presentino un andamento simile in tutte le località.

Abbiamo quindi considerato l'abbondanza media delle varie fasi di sviluppo (IAL, IAN, IAA) (n. zecche/100mq) rispetto alla temperatura e all'umidità verificata a 5 cm dal suolo al momento del campionamento (Grafici 6.6-6.13).



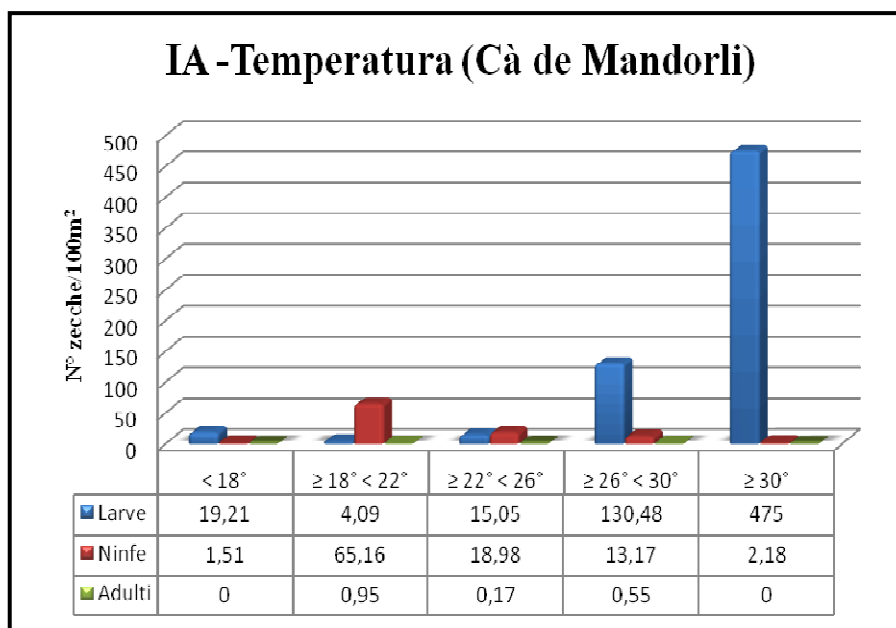


Grafico 6.6: IAL, IAN, IAA in rapporto alla temperatura a 5 cm da terra a Cà de Mandorli.

Le temperature registrate durante tutto il periodo di raccolta in località Cà de Mandorli andavano dai 15,4°C fino ai 37,1°C.

L'IAL medio più elevato si è osservato a temperature  $\geq$  a 30°C mentre per le ninfe il massimo IAN medio è stato osservato tra i 18°C e i 22°C; non sono stati raccolti adulti a temperature <18°C o  $\geq$ 30°C (Grafico 6.6).

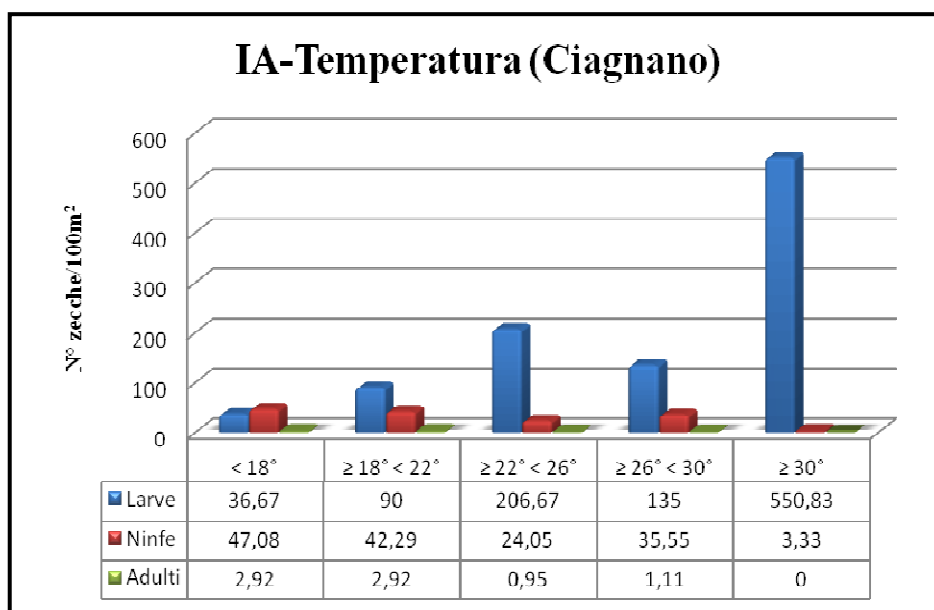


Grafico 6.7: IAL, IAN, IAA in rapporto alla temperatura a 5 cm da terra a Ciagnano.

La temperatura di raccolta a Ciagnano andava dai 14,7°C ai 35,8°C; l'abbondanza media più elevata per le larve si è osservata a temperature  $\geq$ 30°C, mentre i valori di temperatura che sembrano favorire una maggior abbondanza di ninfe sono inferiori a 22°C. Gli adulti, in questo caso, non sono stati osservati solo a temperature  $\geq$ 30°C (Grafico 6.7).

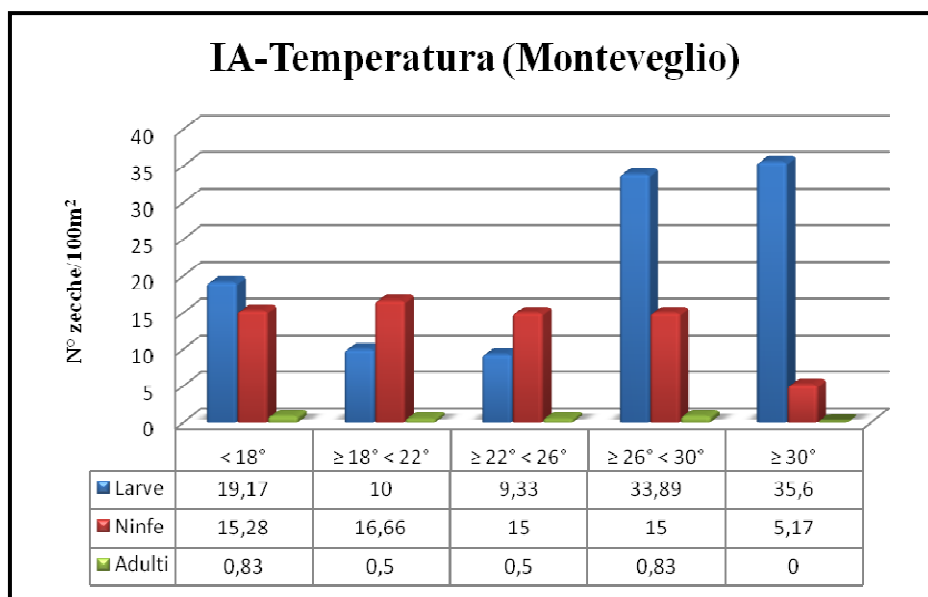


Grafico 6.8: IAL, IAN, IAA in rapporto alla temperatura a 5 cm da terra a Montevoglio.

La temperatura di raccolta a Montevoglio andava dai 10,7°C fino ai 37,9°C; in questo sito, dove l'indice di abbondanza delle zecche è stato inferiore rispetto agli altri parchi, il massimo IAL medio è stato trovato a temperature  $\geq 30^{\circ}\text{C}$ , mentre per le ninfe l'indice di abbondanza più elevato è stato trovato tra i 18°C e i 22°C; anche in questo caso non sono stati raccolti adulti a temperature  $\geq 30^{\circ}\text{C}$  (Grafico 6.8).

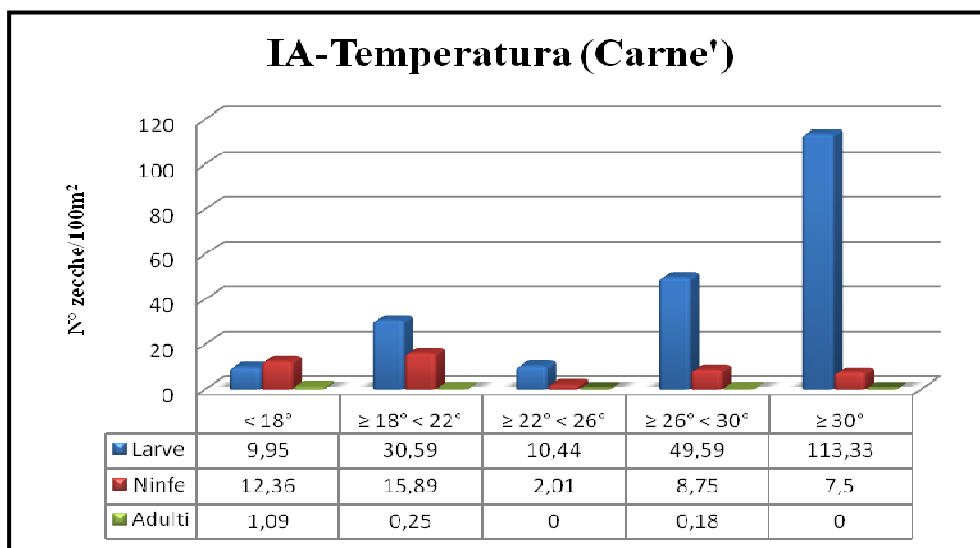


Grafico 6.9: IAL, IAN, IAA in rapporto alla temperatura a 5 cm da terra a Carnè. Le temperature registrate durante il campionamento nel Parco del Carnè variavano da 13,5°C fino a 32,2°C. Anche in questo sito, per quanto riguarda le larve, il massimo indice di abbondanza medio è stato riscontrato a temperature  $\geq 30^{\circ}\text{C}$ , mentre per le ninfe, l'intervallo tra i 18°C e 22°C è stato quello che ha evidenziato un maggior indice di abbondanza; gli adulti non sono stati raccolti a temperature  $\geq 30^{\circ}\text{C}$  (Grafico 6.9).

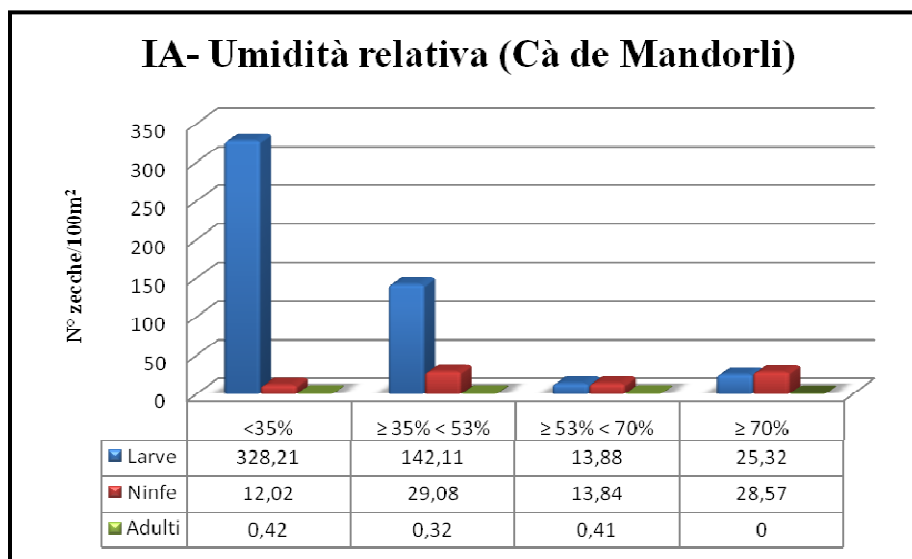


Grafico 6.10: IAL, IAN, IAA in rapporto all'umidità relativa % a 5 cm da terra a Cà de Mandorli.

Durante il campionamento in località Cà de Mandorli l'UR è variata dal 29% al 81%. Si è verificato un maggior IAL medio per UR < 35%, mentre per le ninfe l'IA medio è risultato altalenante ma abbastanza costante. Sono stati raccolti pochi adulti e comunque mai a UR ≥ 70% (Grafico 6.10).

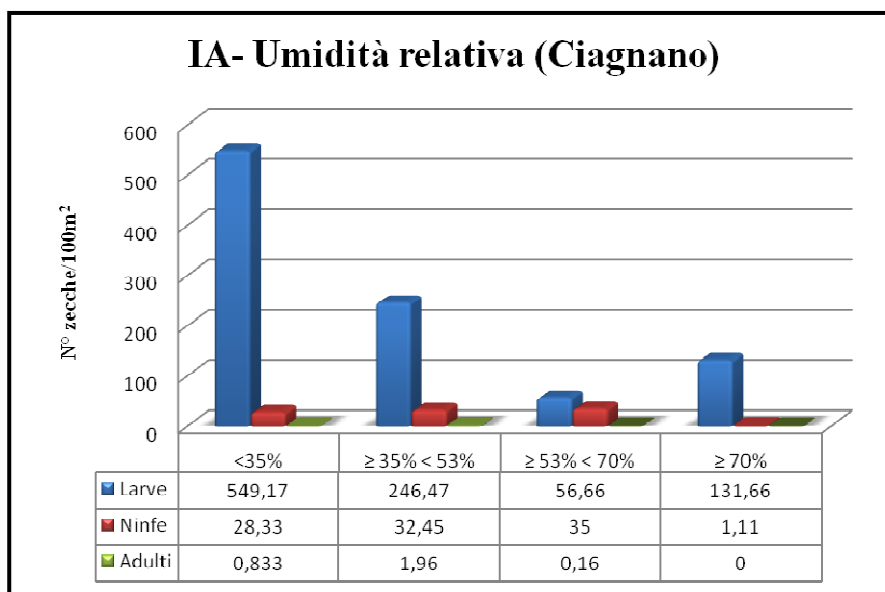


Grafico 6.11: IAL, IAN, IAA in rapporto all'umidità relativa % a 5 cm da terra a Ciagnano.

L' umidità relativa percentuale durante la raccolta in località Ciagnano è variata dal 32% al 75%.

Con una UR<35% l'IAL è risultato più elevato, mentre le ninfe presentano un maggior IA medio tra il 35%-53% di UR. Gli adulti non sono stati raccolti a UR≥ 70% (Grafico 6.11).

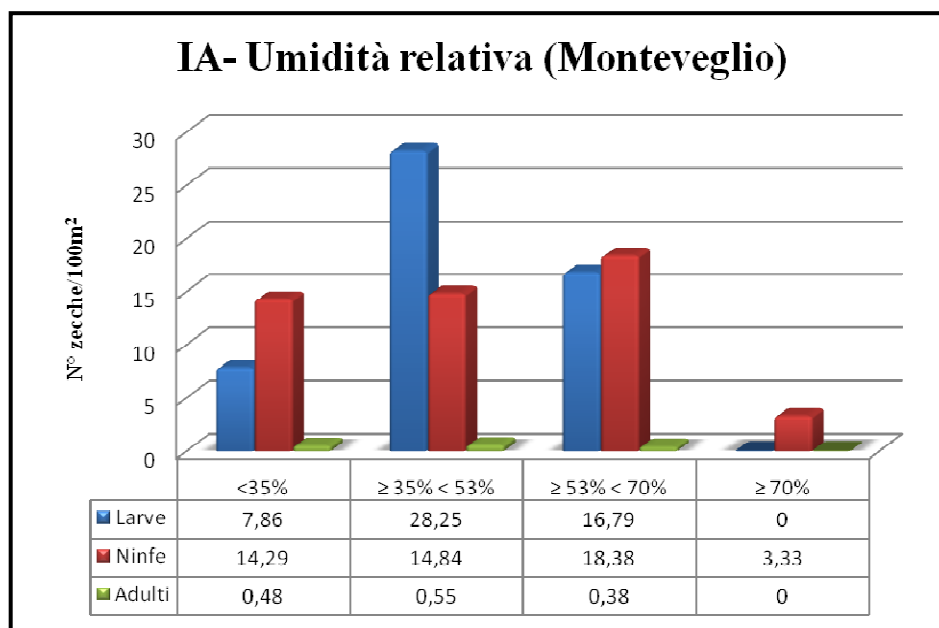


Grafico 6.12: IAL, IAN, IAA in rapporto all'umidità relativa % a 5 cm da terra a Monteveglia.

L'umidità relativa registrata a Monteveglia è variata dal 23% al 74%. L'IAL medio è risultato maggiore a UR ≥35% <53%; mentre le ninfe risultano più attive con UR ≥53% <70%. Nessun adulto è stato trovato a UR ≥70% (Grafico 6.12).

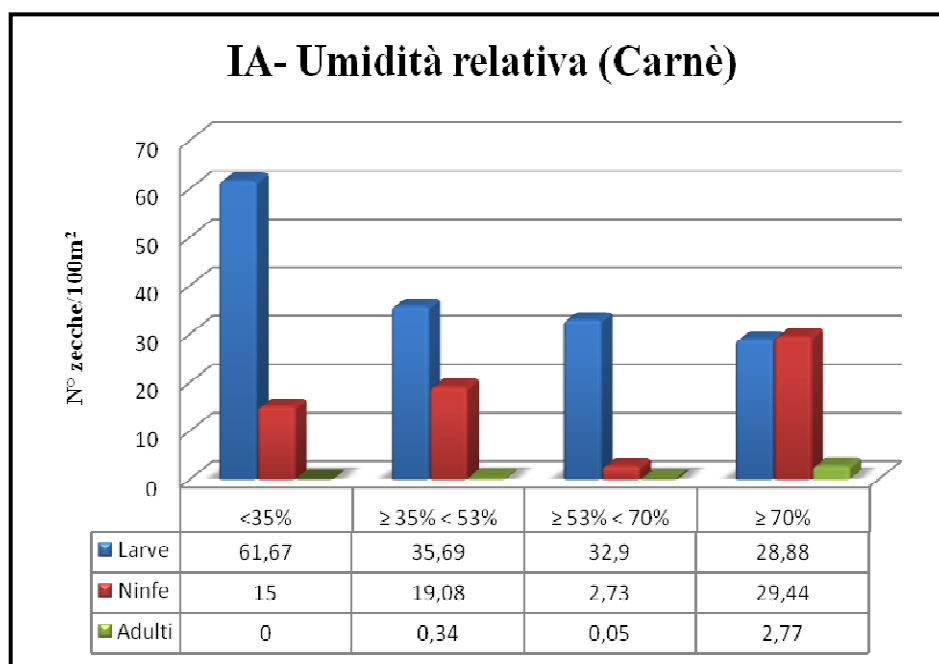


Grafico 6.13: IAL, IAN, IAA in rapporto all'umidità relativa % a 5 cm da terra a Carnè.

L'UR registrata nel parco del Carnè variava dal 32% al 76%. Il maggior IAL medio è stato riscontrato in corrispondenza di un UR <35%, mentre l'IAN medio è maggiore a UR  $\geq 70\%$ . A differenza degli altri siti gli adulti sono stati trovati anche ad UR  $\geq 70\%$ , mentre nessun adulto è stato trovato a UR <35% (Grafico 6.13).

Globalmente (Grafico 6.14) l'indice di abbondanza delle larve tende ad aumentare al crescere della temperatura a terra, in particolare il maggior IAL è stato riscontrato per temperature  $\geq 30^\circ\text{C}$ .

Viceversa l'indice di abbondanza delle ninfe tende a decrescere all'aumentare della temperatura con la massima abbondanza registrata a temperature comprese tra i  $18^\circ\text{C}$  e i  $21^\circ\text{C}$ .

Gli adulti non sono mai stati trovati a temperature  $\geq 30^\circ\text{C}$ .

Come illustrato dai grafici 6.15, 6.16 e 6.17 è possibile evidenziare, all'interno del range delle temperature osservate nel periodo di campionamento, una correlazione positiva per quanto riguarda l'IAL e la temperatura stessa e negativa per quello che concerne le ninfe e gli adulti. Le differenze evidenziate (maggiore è la temperatura, maggiore è la IAL; e minore sono le IAN e IAA) sono risultate statisticamente significative al test di correlazione non parametrica Rho di Spearman.

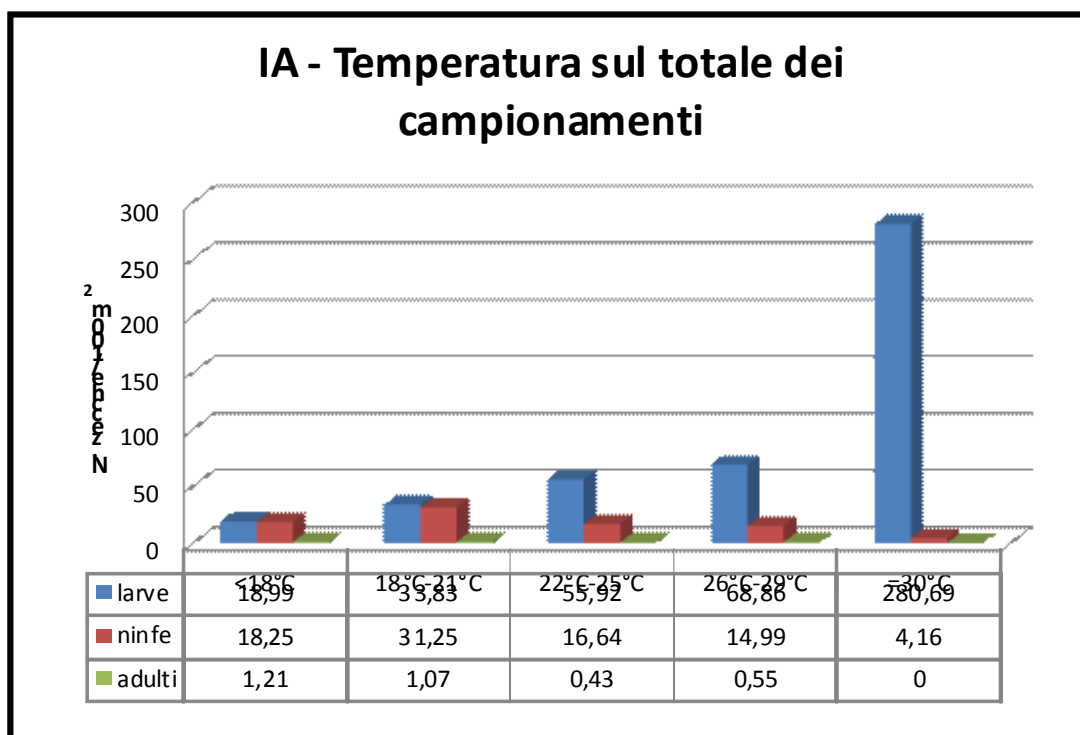


Grafico 6.14: IAL, IAN, IAA in rapporto alla temperatura registrata a 5 cm da terra calcolata sul totale dei campionamenti

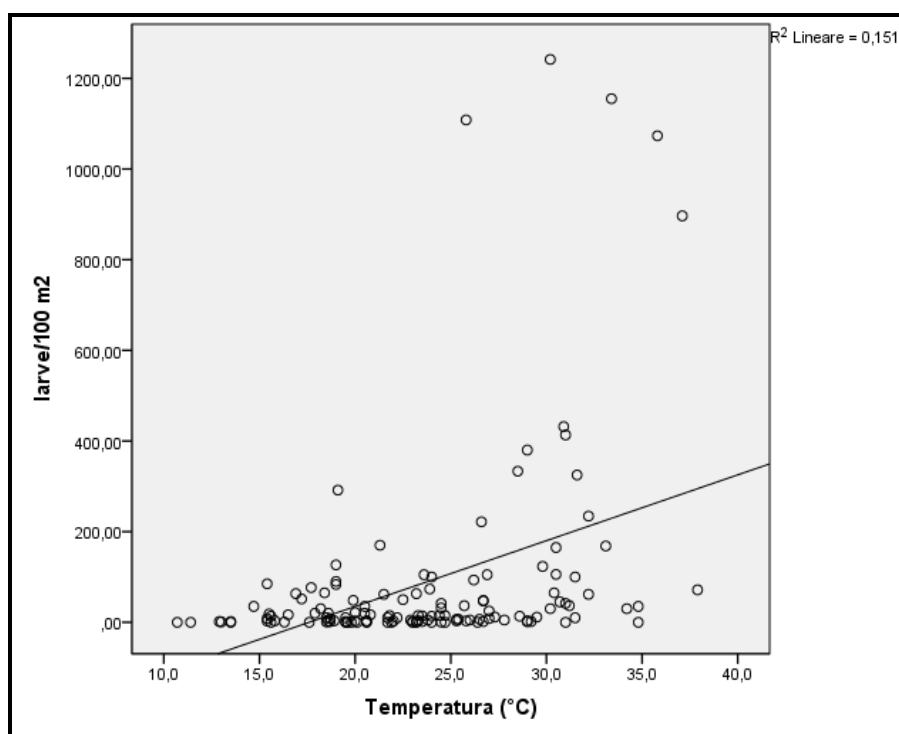


Grafico 6.15: IA di larve in relazione alla temperatura

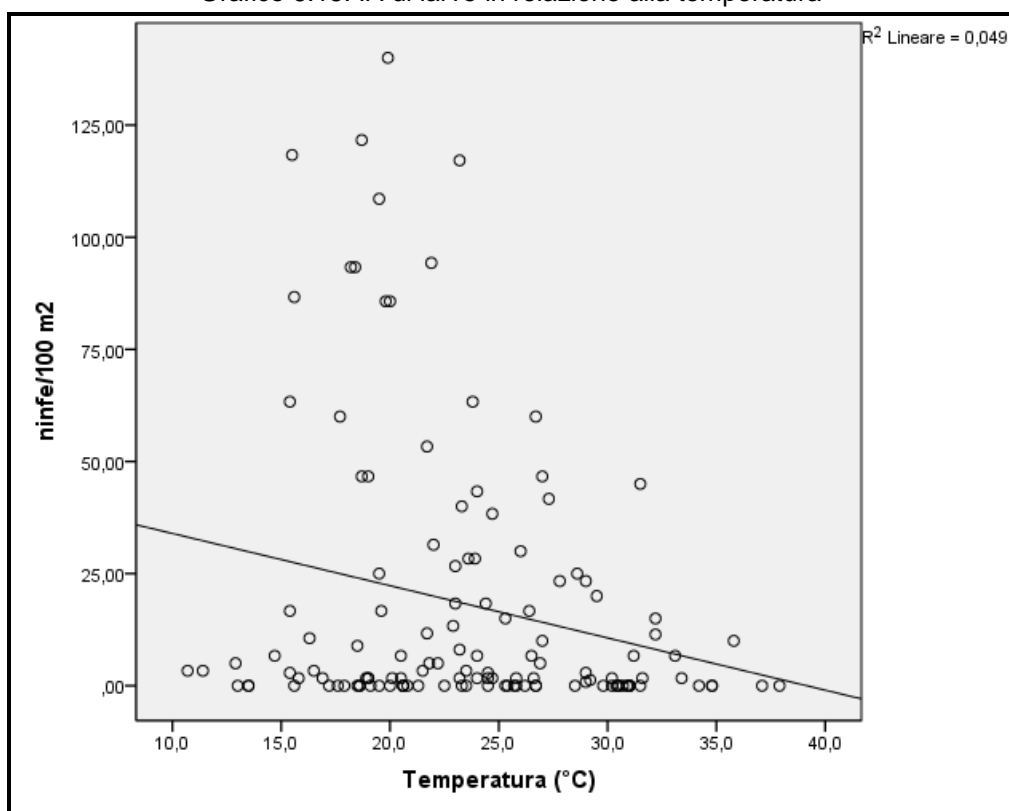


Grafico 6.16: IA di ninfe in relazione alla temperatura

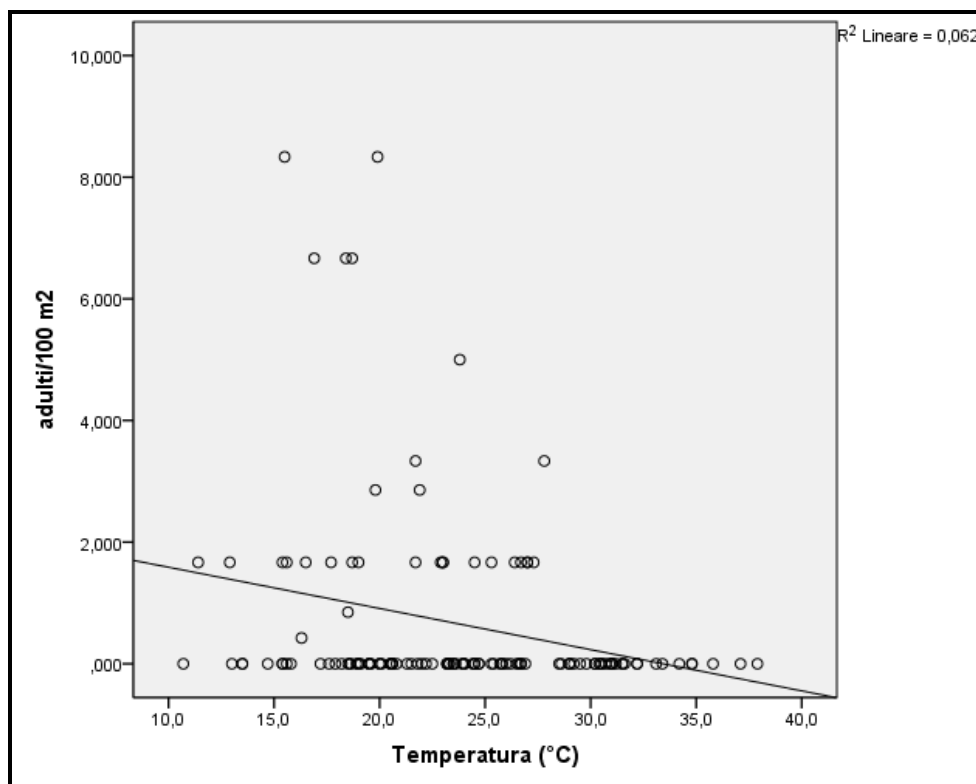


Grafico 6.17: IA di adulti in relazione alla temperatura

Per quanto riguarda l'umidità relativa, globalmente un maggior IAL è stato osservato con UR <35%; l'abbondanza poi decresce all'aumentare dell'umidità. In questo caso però le differenze non sono risultate statisticamente significative. Per le ninfe e per gli adulti, viceversa, si riscontra un andamento altalenante, ma abbastanza costante all'aumentare dell'umidità (grafico 6.18).

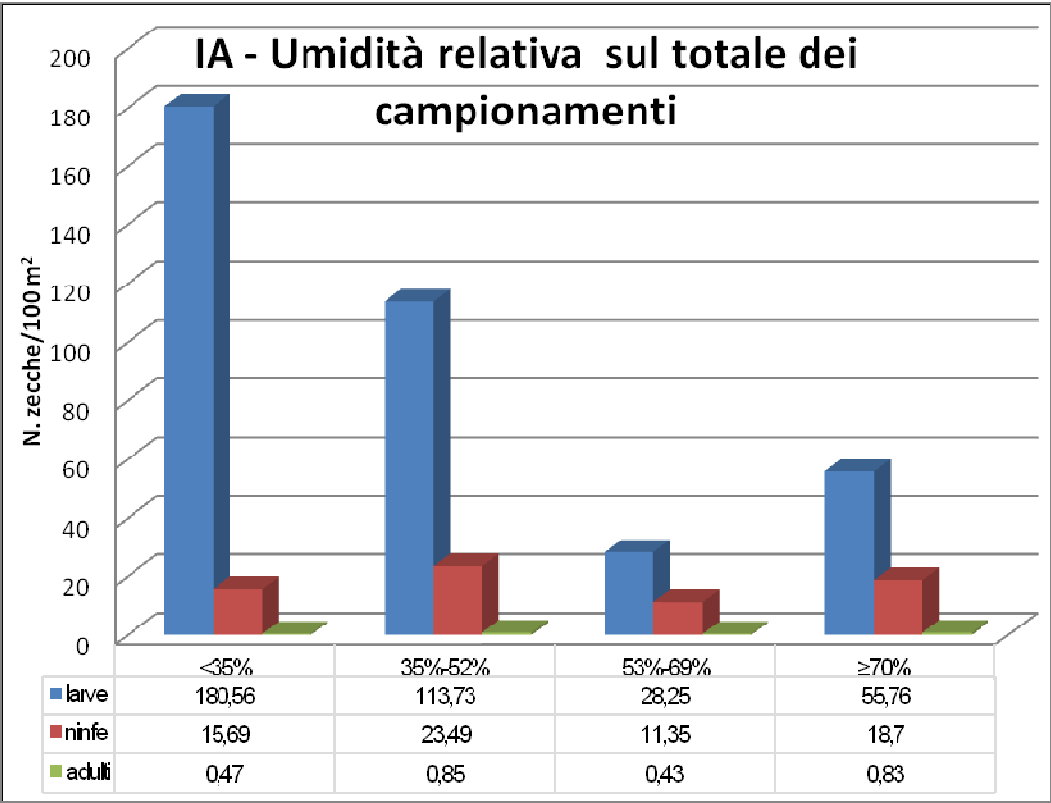


Grafico 6.18: IAL, IAN, IAA in rapporto all’umidità relativa % registrata a 5 cm da terra calcolata sul totale dei campionamenti.

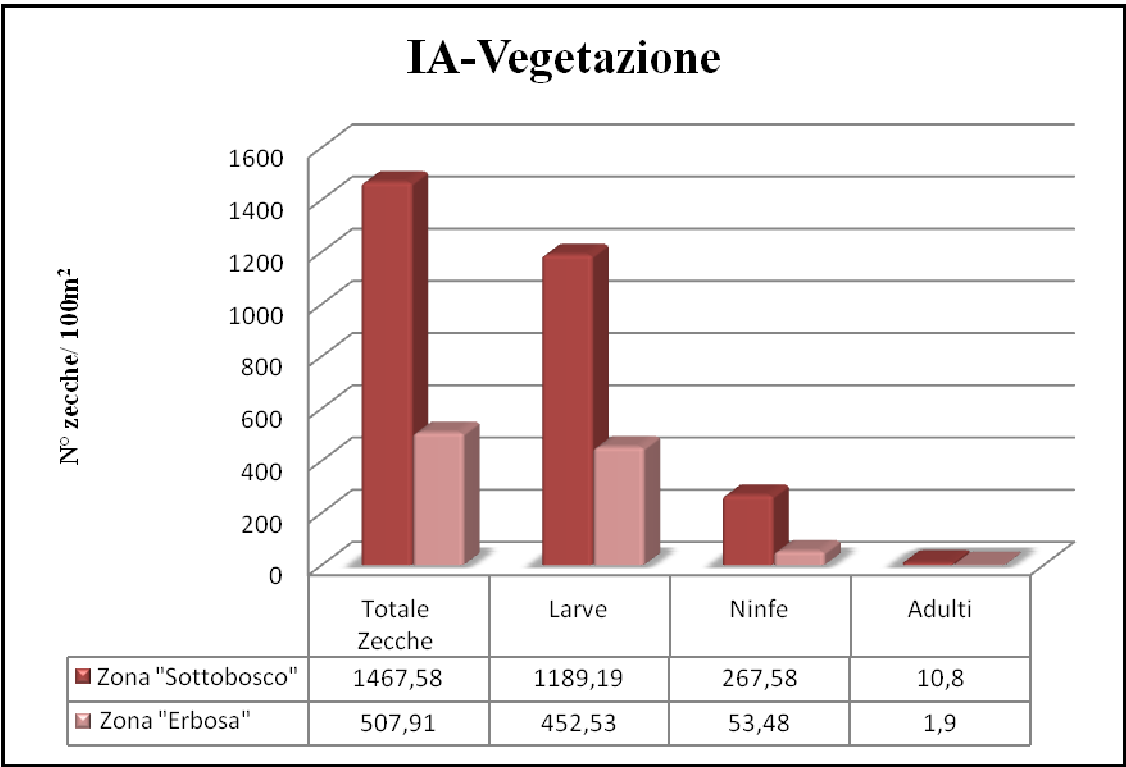


Grafico 6.18: IA, IAL, IAN, IAA in rapporto al tipo di vegetazione.



Infine, considerando la vegetazione presente nei vari *transects* di raccolta (Grafico 6.18), è stato possibile osservare come, in genere e più in particolare per le larve e le ninfe, la maggior abbondanza è stata riscontrata nella zona di sottobosco, in aree in cui il manto erboso era assente, ma si riscontrava solo la presenza di piccoli arbusti e/o di terreno coperto da foglie secche e rada vegetazione rampicante (es. *Hedera helix*).

“FEEDING TICKS”

Per quanto riguarda le 73 zecche catturate in fase di alimentazione, le specie riscontrate sono riportate in tabella 6.3 differenziate in relazione a stadio, sesso e ospite su cui sono state rinvenute.

SPECIE	NUMERO	STADIO/SESSO	OSPITE
<i>Ixodes ricinus</i>	37	19 femmine	11 da 5 cani 4 da 3 cavalli 3 da un gatto 1 da 1 uomo
		13 maschi	12 da 2 cani 1 da 1 uomo
		5 ninfe	da 4 uomini
<i>Ixodes acuminatus</i>	1	femmina	da 1 cane
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	7	2 femmine	da 1 cane
		5 maschi	da 2 cani
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	21	9 femmine	da 3 cavalli
		12 maschi	da 3 cavalli da 1 cane da 1 uomo
<i>Rhipicephalus bursa</i>	2	1 femmina	da 1 cane
		1 maschio	da 1 bovino
<i>Hyalomma m. marginatum</i>	3	1 femmina	da 1 cavallo
		2 maschi	da 1 cavallo
<i>Hyalomma d. detritum</i>	1	maschio	da 1 cavallo
<i>Hyalomma d. scupense</i>	1	maschio	da 1 cavallo

Tabella 6.3: Zecche prelevate in fase di alimentazione su uomo o animali

Come nel caso dei campionamenti ambientali, su 73 zecche raccolte in fase di alimentazione la specie più frequente è risultata essere *I. ricinus* con 37 esemplari tra maschi, femmine e ninfe, seguita da *R. turanicus* (21 soggetti adulti) e *R. sanguineus* (7), più altre specie più rare presenti in un numero esiguo. Mentre *I. ricinus* è stata ritrovata su diverse specie animali, incluso l'uomo, le zecche appartenenti al genere *Hyalomma* sono state riscontrate solo sul cavallo, specie che è risultata inoltre infestata anche da *R. turanicus*. *R. sanguineus* si conferma la specie tipica del cane, essendo stata rinvenuta solo in questo animale, sul quale peraltro sono stati ritrovati anche un esemplare di *R. turanicus* e uno di *R. bursa*; quest'ultimo è stato riscontrato anche su un bovino. Sull'uomo sono state ritrovate zecche prevalentemente appartenenti alla specie *I. ricinus*, ma anche un esemplare di *R. turanicus*.

## 6.2 RICERCA DI PATOGENI TRASMESSI DALLE ZECHE

In tabella 6.4 sono evidenziate il numero totale di zecche raccolte dall'ambiente, suddivise per specie, stadio di sviluppo e località di campionamento, che sono state sottoposte a indagini molecolari per la ricerca di patogeni. Come evidenziato nei Materiali e Metodi, queste analisi sono state effettuate su campioni formati da pool di 10 larve o 5 ninfe (ogni pool comprendeva soggetti provenienti dallo stesso *transect* e appartenenti alla stessa specie) o dai singoli soggetti adulti. Per quanto riguarda le 73 zecche raccolte dagli animali, sono stati esaminati i soggetti adulti singolarmente (68 campioni), mentre le 5 ninfe, isolate su 4 diverse persone, non permettevano di costituire un pool sufficiente, per cui non sono state analizzate.

SPECIE	STADIO	CA' DE MANDORLI	CIAGNANO	MONTEVEGLIO	CARNÈ
<i>I. ricinus</i>	Larve	110/11	210/21	-	-
	Ninfe	215/43	445/89	280/56	220/44
	Femmine	2	12	4	3
	Maschi	2	15	7	7
<i>S. frontalis</i>	Larve	-	-	-	-
	Ninfe	-	5/1	-	-
	Femmine	-	-	-	-
	Maschi	-	-	-	-
<i>D. marginalis</i>	Larve	-	-	-	-
	Ninfe	-	-	-	-
	Femmine	-	-	-	-
	Maschi	1	-	-	-
<i>Dermacentor spp</i>	Larve	-	10/1	-	-
	Ninfe	-	-	-	-
	Femmine	-	-	-	-
	Maschi	-	-	-	-
<i>I. acuminatus</i>	Larve	-	-	-	-
	Ninfe	-	-	-	-
	Femmine	-	2	-	1
	Maschi	-	-	-	-
<i>Hyalomma m.marginatum</i>	Larve	-	-	-	-
	Ninfe	-	-	-	-
	Femmine	-	2	-	-
	Maschi	-	1	-	-
<b>Totale</b>		<b>330/59</b>	<b>702/144</b>	<b>291/67</b>	<b>231/55</b>

Tabella 6.4: Zecche/N. campioni esaminati tra quelli prelevati dall'ambiente

In totale sono stati analizzati 325 campioni di zecche prelevate dall'ambiente, di

cui 59 campioni da Cà de Mandorli, 144 campioni da Ciagnano, 67 campioni da Monteveglio e 55 campioni da Carnè.

In tabella 6.5 sono evidenziati i singoli campioni delle zecche analizzate raccolte dall'ambiente.

	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>Ixodes. acuminatus</i>	<i>Scafioxodes frontalis</i>	<i>Hyalomma marginatum</i>	<i>Dermacentor spp.</i>	Totale
Adulto	21 femmine 31 maschi	3 femmine	-	2 femmine 1 maschio	1 maschio	27 femmine 32 maschi
Ninfa	232 pools	-	1 pool	-	-	233 pools
Larva	32 pools	-	-	-	1 pool	33 pools
Totale	316 campioni	3 campioni	1 campione	3 campioni	2 campioni	<b>325 campioni</b>

Tabella 6.5: composizione dei campioni di zecche ambientali analizzati.

### 6.2.1 RICERCA DI PIROPLASMI

Su 393 campioni esaminati, (325 campioni ambientali più 68 zecche in fase di alimentazione) 30 (7,6%) sono risultati positivi per piroplasmi alla PCR, evidenziando una banda a circa 400 bp, come evidenziato in Figura 6.18.

Di questi 28 erano campioni dall'ambiente e due zecche in fase di alimentazione sull'ospite.

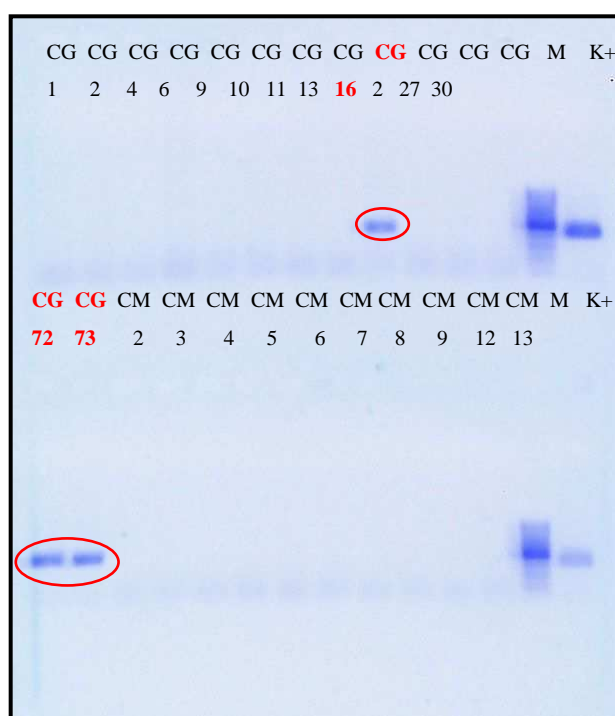


Figura 6.18: Corsa su gel di amplificati derivanti da campioni di Ciagnano. Evidenziati in rosso i campioni positivi.

In totale sono risultate positive:

- 1 femmina *I. ricinus*

- 4 maschi: 3 *I. ricinus* e 1 *H. m. marginatum*
- 25 pool di ninfe
- nessuno dei pool di larve esaminati è stato riscontrato positivo.

Fra le “questing ticks” solo i campioni di *I. ricinus* sono risultati positivi e, pur con prevalenze diverse, sono stati ritrovati in tutti i siti di campionamento: Monteveglio (12 campioni positivi/67 campioni totali-17,9%), Ca' de Mandorli (2 campioni positivi/59 campioni totali-3,4%), Ciagnano (11 campioni positivi/144 campioni totali-7,6%) e parco Carné (3 campioni positivi/55 campioni totali-5,4%). La prevalenza è risultata significativamente maggiore nelle zecche raccolte presso il parco di Monteveglio (17.9%) (grafico 6.17).

Per quanto riguarda i campionamenti dagli animali, sono risultati positivi un maschio di *I. ricinus* prelevato da un cane e uno di *H. m. marginatum* raccolto su un cavallo.

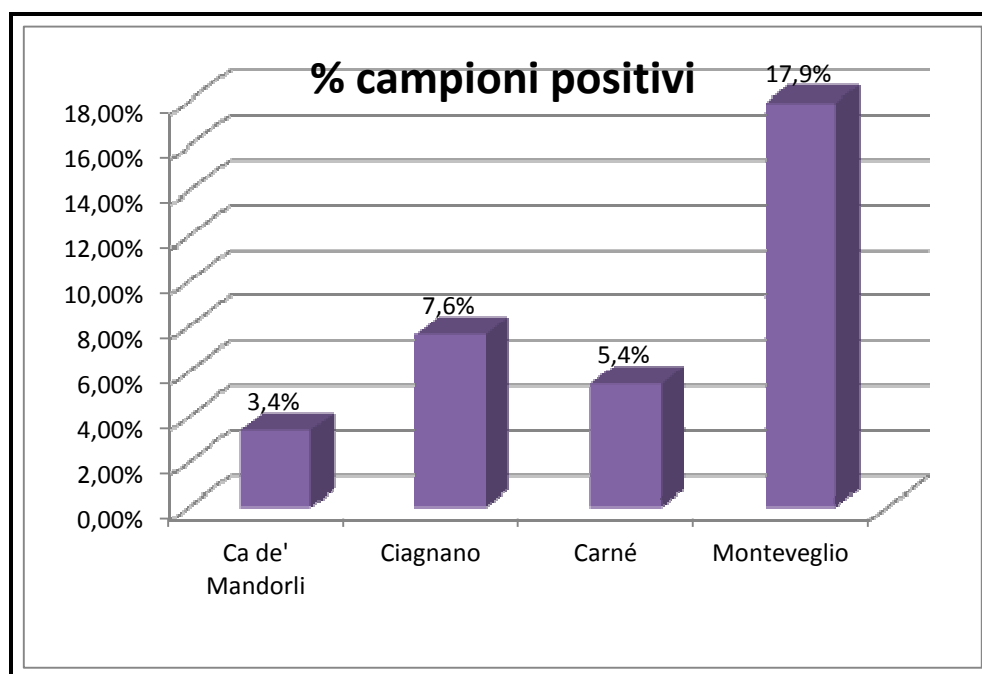


Grafico 6.17: Positività alla PCR di campioni di zecche raccolti nei diversi siti di campionamento.

Indipendentemente dalla zona di campionamento, la positività è stata riscontrata solo in campioni di zecche raccolti nei mesi di Aprile, Maggio e Giugno, con maggior frequenza nel mese di Maggio (Grafico 6.18). In questo mese sono anche state raccolte ed esaminate un maggior numero di zecche.

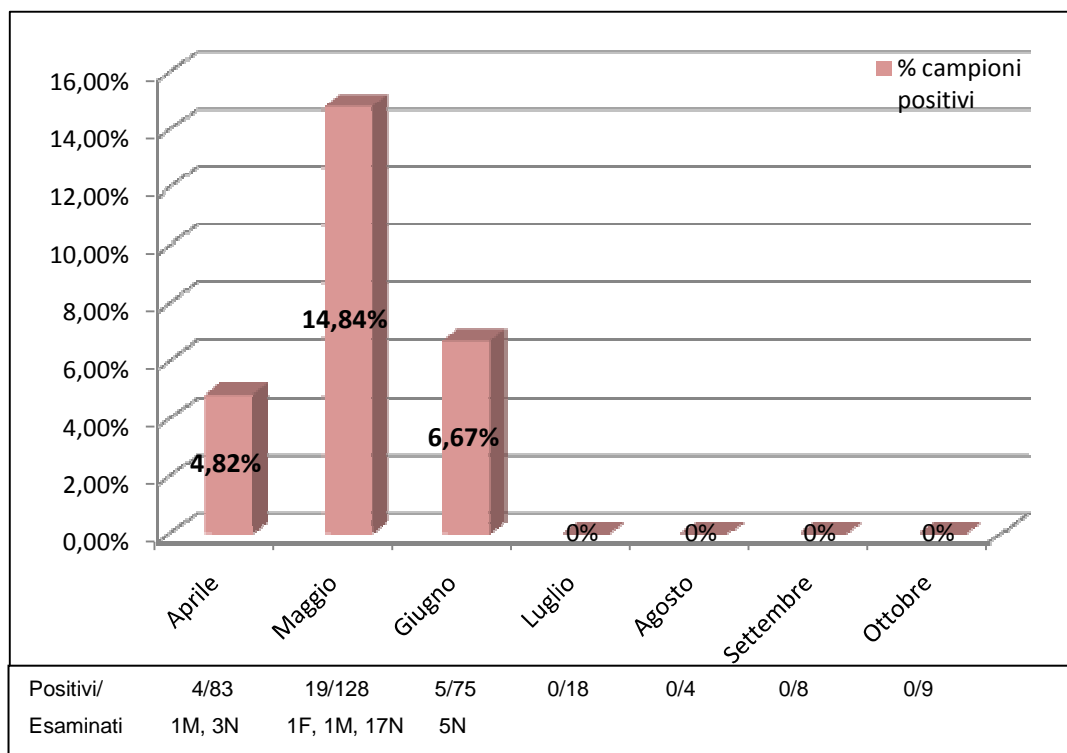


Grafico 6.18: Positività alla PCR per piroplasmi in campioni di zecche raccolte dall'ambiente in diversi periodi dell'anno. (M= maschio, F= femmina, N= pool di ninfe)

Come si può osservare nel grafico 6.19, la maggior frequenza di positività alla PCR è stata osservata nei campioni formati da pool di ninfe.

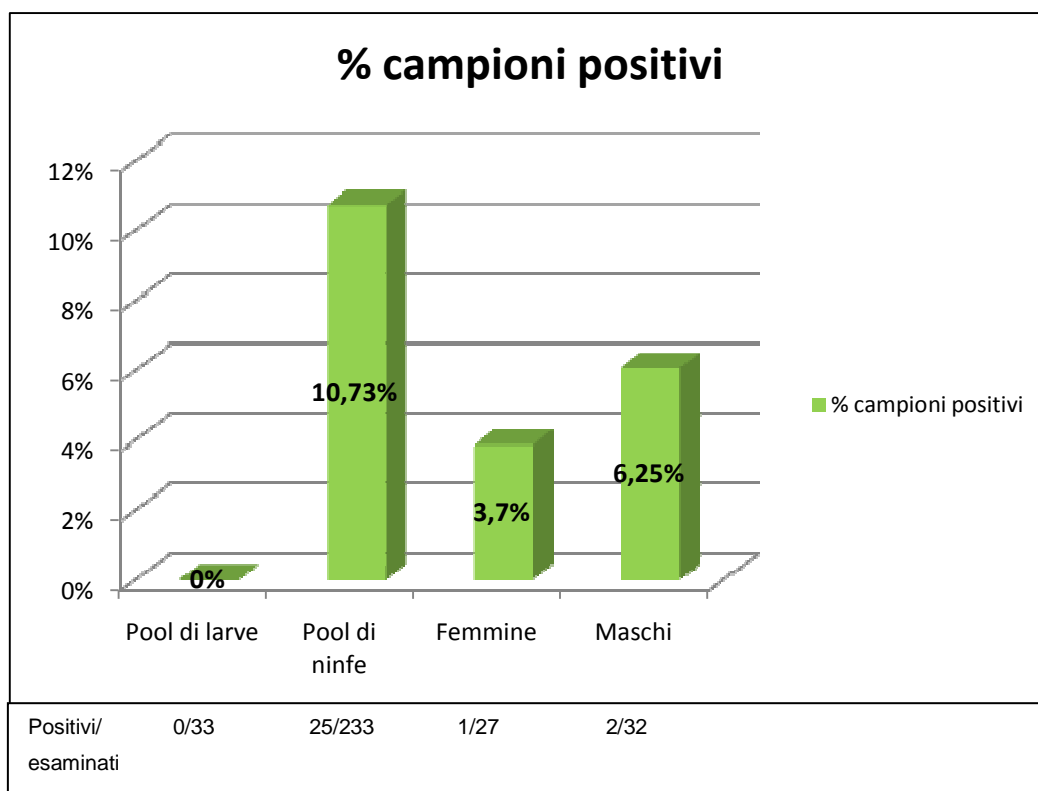


Grafico 6.19: Prevalenza di positività alla PCR per piroplasmi nei diversi stadi di sviluppo delle zecche raccolte dall'ambiente.

Maggior frequenza di isolamento si è inoltre osservata negli esemplari catturati quando la temperatura ambientale, riscontrata al momento della cattura, era superiore ai 35°C (Grafico 6.20), ed in condizioni di umidità al momento della raccolta inferiore al 30% (Grafico 6.21).

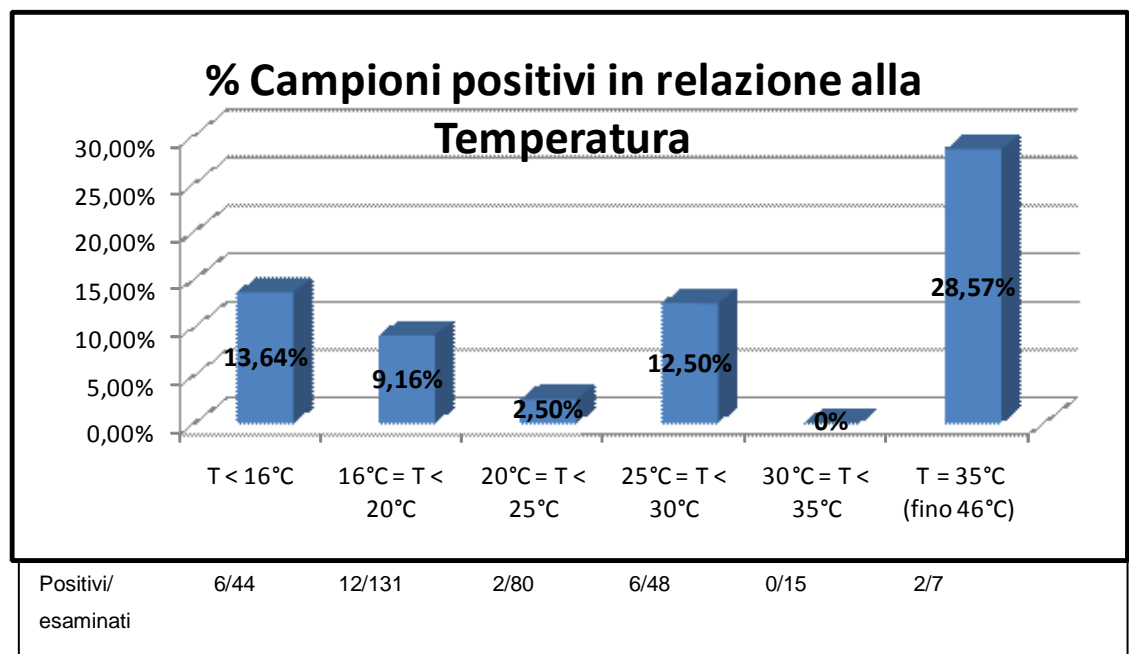


Grafico 6.20: Percentuale di positività alla PCR per piroplasma dei campioni di zecche ambientali in relazione alla temperatura al momento della raccolta.

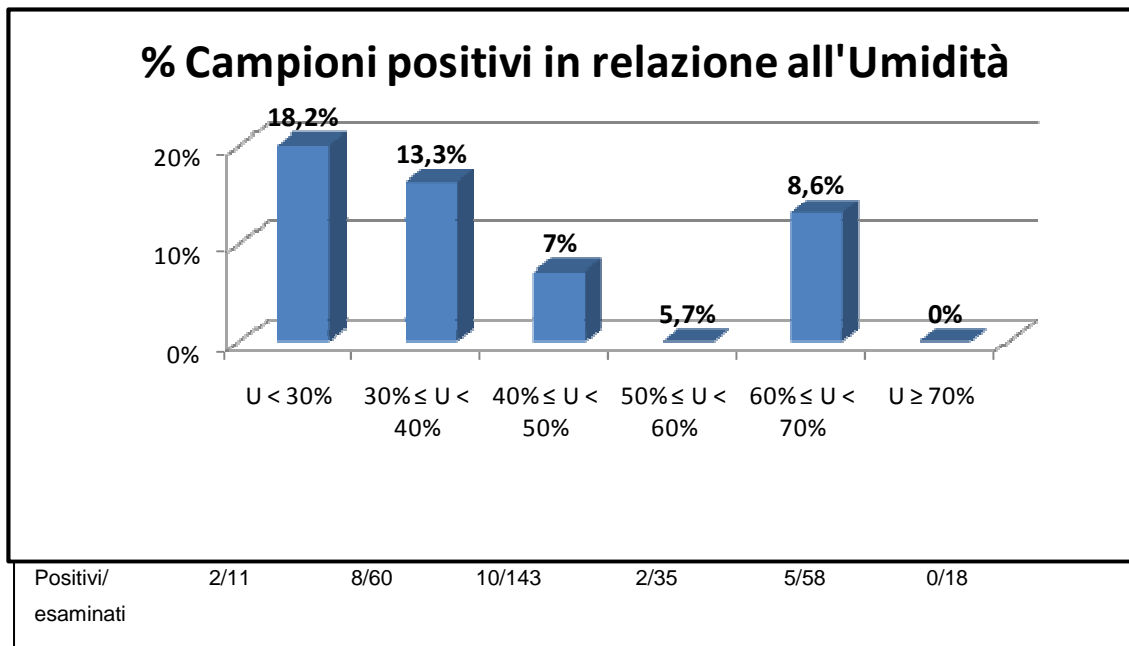


Grafico 6.21: Percentuale di positività alla PCR per piroplasma dei campioni di zecche ambientali in relazione all'umidità al momento della raccolta.

Le differenze di positività in base a stadio di sviluppo, periodo di cattura, temperatura ed umidità non sono però risultate significative al test del  $\chi^2$ .

Dopo il sequenziamento dei prodotti di PCR ottenuti dalle zecche, è stato possibile identificare tramite BLAST i piroplasma presenti, che sono riconducibili a tre specie/gruppi:

1. **Babesia EU1**: 100% di identità con GU647159, primo isolato in Italia da zecca (Cassini e coll., 2010), e con altri isolati da zecche di paesi europei; è stato riscontrato in 11 campioni di zecche ambientali costituiti sia da pool di ninfe, che da una femmina e da un maschio, provenienti da tutti i siti di campionamento (Tab. 6.6).
2. **Babesia divergens/capreoli**: 99% di identità con FJ944828 (*B. capreoli*) e con AY572456 (*B. divergens*), è stata riscontrata in 2 pool di ninfe raccolti presso il Parco del Carné.
3. *Theileria* spp. rientranti nel complesso **Theileria buffeli/sergenti/orientalis**: con percentuali di identità differenti, comprese tra 85% e 100%, differenziate in base alla provenienza dei 17 campioni positivi, come descritto di seguito:
  - Montevoglio: 11 isolati che hanno presentato 100% di identità con HM538222 – AB520956 – AB520955 (*T. orientalis*), HM538197 (*T. buffeli*) e AJ616718 (*Theileria* sp.);
  - Ca' de Mandorli: un campione con percentuale d'identità del 100% con HM538223 – FJ822144 (*T. sergenti*), AJ661513 (*T. buffeli*) e AB520953 (*T. orientalis*);
  - Ciagnano: tutti e tre i campioni hanno presentato 85-88% di identità con: FJ225391 – HM538197 (*T. buffeli*), AB520955 (*T. orientalis*) e AJ616718 (*Theileria* sp.); due degli avevano sequenza identica;
  - Campioni da animali: in un campione ottenuto da un maschio di *H. m. marginatum* campionato da un cavallo (AN35) è stato evidenziato un ceppo con l'89% di omologia con *T. sergenti* (FJ225392), mentre un campione estratto da un maschio di *I. ricinus* campionato su un cane (AN25) ha mostrato l'86% di analogia con *T. buffeli* (FJ225391).

In Tabella 6.6 e nei grafici 6.22-6.25 sono illustrate le distribuzioni dei diversi piroplasma riscontrati in zecche ambientali, in base al sito di campionamento.



Località	Esaminati	Positivi totali	<i>Babesia</i> EU1	<i>Babesia capreoli/ divergens</i>	<i>Theileria buffeli/ sergenti/ orientalis</i>
Ca' de Mandorli	59	2 (3.4%)	1 pool ninfe	-	1 pool ninfe
Ciagnano	144	11 (7.6%)	1 femmina 1 maschio 6 pool ninfe	-	3 pool ninfe
Parco Carné	55	3 (5.4%)	1 pool ninfe	2 pool ninfe	-
Monteveglia	67	12 (17.9%)	1 pool ninfe	-	1 maschio 10 pool ninfe
Totale	325	28 (8,6%)	11 (3,4%)	2 (0,6%)	15 (4,6%)

Tabella 6.6 Campioni ritrovati positivi per le diverse specie di piroplasmi nelle diverse località di campionamento.

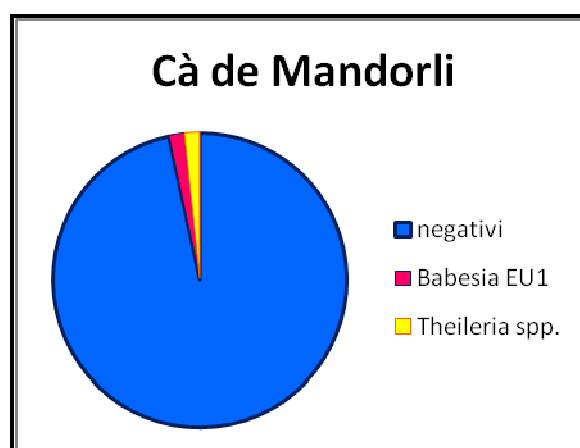


Grafico 6.22: Suddivisione dei campioni positivi ai diversi piroplasmi a Cà de Mandorli

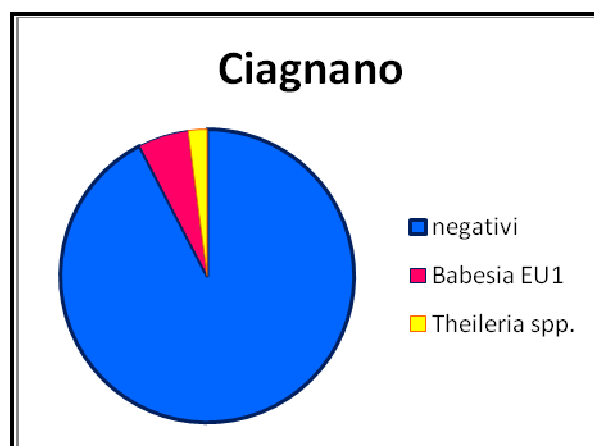


Grafico 6.23: Suddivisione dei campioni positivi ai diversi piroplasmi a Ciagnano

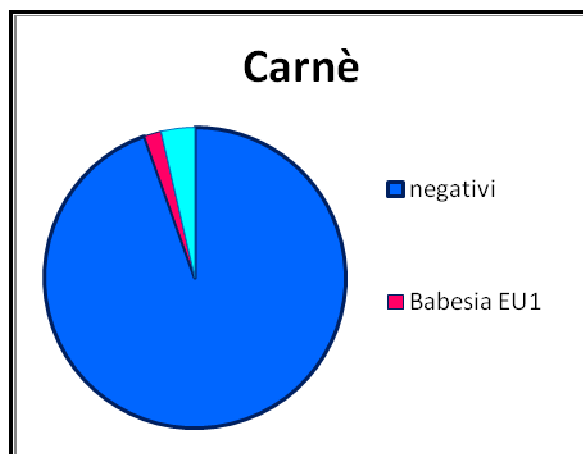


Grafico 6.24: Suddivisione dei campioni positivi ai diversi piroplasmi a Carnè

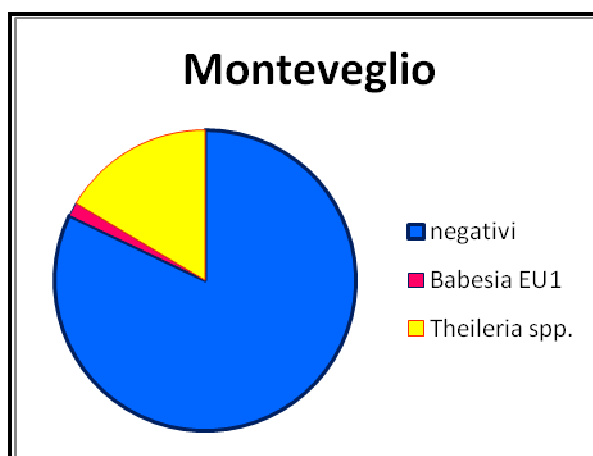


Grafico 6.25: Suddivisione dei campioni positivi ai diversi piroplasmi a Monteveglia

Come si può osservare dal grafico 6.25, a Monteveglia, che è stato anche il sito in cui si aveva una maggiore prevalenza di piroplasmi nelle zecche, la specie predominante appartiene al complesso *T. buffeli/sergenti/orientalis*. Viceversa a Ciagnano (grafico 6.23), in cui la prevalenza dei piroplasmi nelle zecche è solo di poco più bassa rispetto a Monteveglia, la specie prevalente risulta essere *Babesia EU1*. *B. capreoli/divergens* è stata riscontrata solo in zecche raccolte nel Parco del Carnè (grafico 6.24).

Gli alberi filogenetici costruiti con Mega 5, evidenziano come i nostri isolati riferibili a *Babesia* EU1 (tutti uguali fra loro), formino un cluster con i vari isolati della stessa specie presenti in GenBank, nettamente distinto dal cluster contenente gli isolati riferibili sia a *Babesia capreoli* sia a *B. divergens* (Figura 12). Il frammento da noi sequenziato è compreso in una regione conservata del genoma (18S-rRNA) e non permette di distinguere tra la due specie.

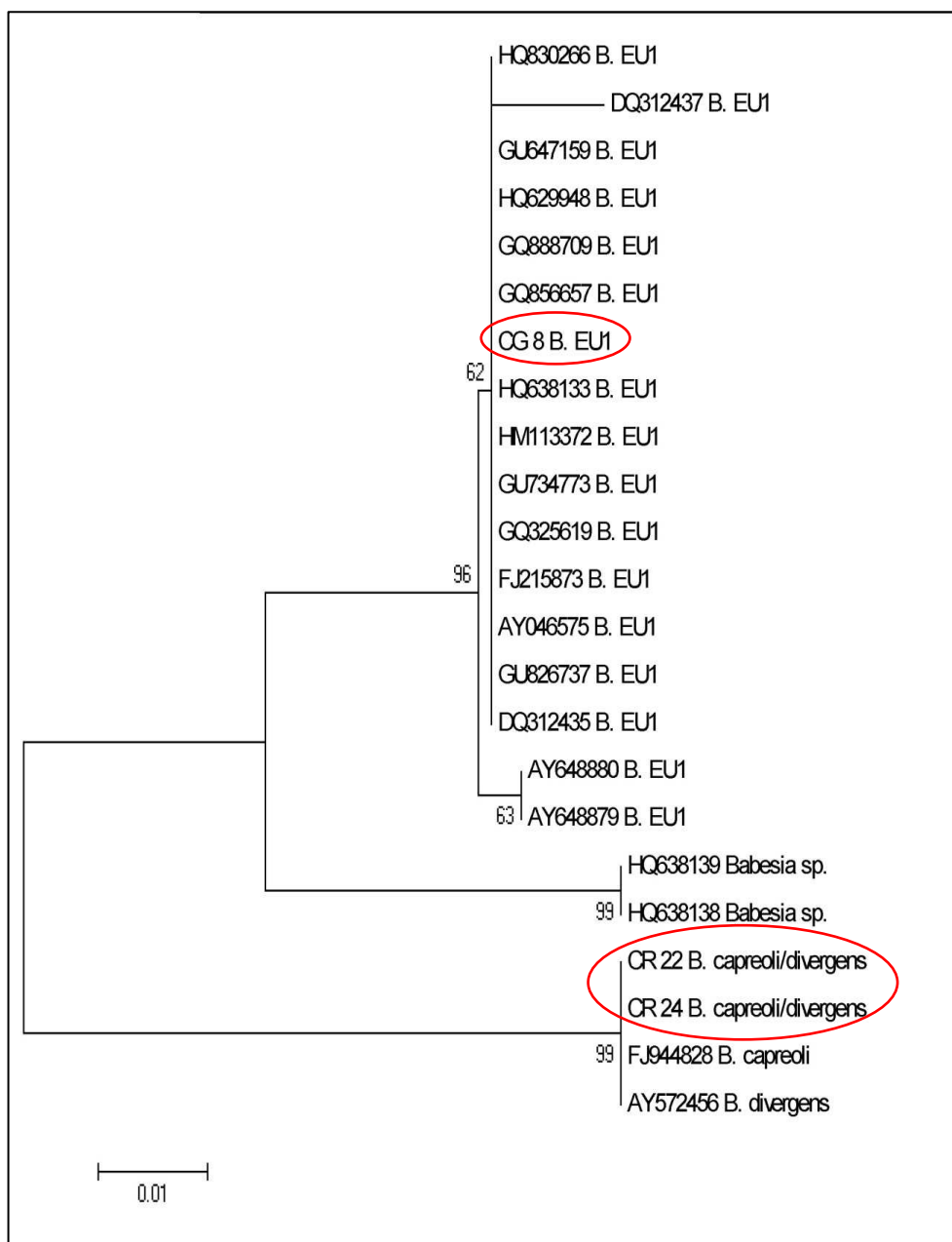


Figura 6.19: Albero filogenetico di isolati di *Babesia* EU1 e *Babesia capreoli/divergens*. Sono evidenziati in rosso i campioni da noi ritrovati.

Per quanto riguarda *Theileria* è interessante notare (Figura 6.20) come gli isolati da zecche di provenienza diversa formino dei cluster separati gli uni dagli altri. L'isolato da *H. m. marginatum* prelevato dal cavallo (AN35) clusterizza con gli isolati delle zecche di Ciagnano, mentre l'isolato da *I. ricinus* raccolta sul cane (AN25) si differenzia nettamente dagli altri raggruppamenti. Entrambi gli animali vivevano nel territorio del Parco dei Gessi.

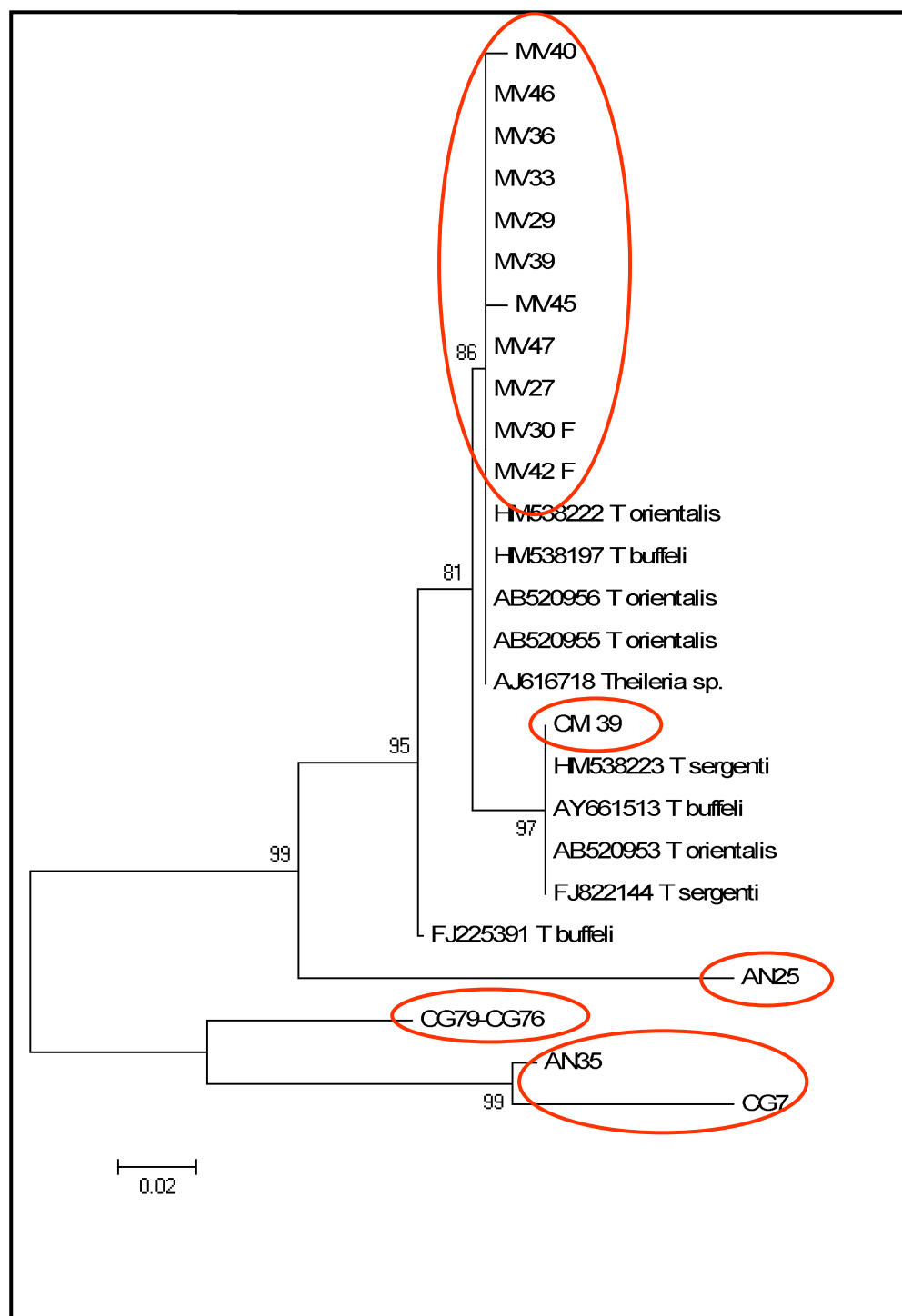


Figura 6.20: Albero filogenetico di *Theileria buffeli/sergenti/orientalis*. Sono stati evidenziati i campioni da noi ritrovati.

### 6.2.2 RICERCA DI ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM

Un totale di 33 campioni (9,2%) sui 360 analizzati per la ricerca di *A. phagocytophilum* è risultato positivo alla real-time PCR. *I. ricinus* è l'unica specie risultata positiva tra i campioni di zecche ambientali. L'analisi del  $\chi^2$  ha evidenziato come i risultati di prevalenza ottenuti al Parco del Carnè (0/55) differiscano significativamente con le prevalenze riscontrate negli altri 3 siti di campionamento ( $p < 0,05$ ), mentre non risultano differenze significative tra ninfe e adulti. *I. ricinus* è anche la più frequentemente positiva nei campioni ottenuti da zecche in fase di alimentazione: i campioni positivi sono stati trovati sul cane, sul gatto o sull'uomo. Tra le "feeding ticks" sono risultate positive anche altre specie prelevate su cani: 1 *Rhipicephalus turanicus*, 1 *R. bursa*, 1 *R. sanguineus* e 1 *I. acuminatus* (Tab. 6.7).

Specie	CM	CG	MV	CR	AN	Totale
<i>I. ricinus</i>						
• ninfe	5/43 (11,6%)	6/89 (6,7%)	8/56 (14,3%)	0/44 (0%)	0/0	19/232 (8,2%)
• adulti	0/4 (0%)	2/27 (7,4%)	2/11 (18,2%)	0/10 (0%)	6/32 (18,7%)	10/84 (11,9%)
<i>I. acuminatus</i>						
• ninfe	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
• adulti	0/0	0/2 (0%)	0/0	0/1 (0%)	1/1 (100%)	1/4 (25%)
<i>D. marginalis</i>						
• ninfe	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
• adulti	0/1 (0%)	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1 (0%)
<i>H. marginatum</i>						
• ninfe	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
• adulti	0/0	0/3 (0%)	0/0	0/0	0/3 (0%)	0/6 (0%)
<i>H. d. scupense</i>						
• ninfe	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
• adulti	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1 (0%)	0/1 (0%)
<i>H. d. detritum</i>						
• ninfe	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
• adulti	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1 (0%)	0/1 (0%)
<i>S. frontalis</i>						
• ninfe	0/0	0/1 (0%)	0/0	0/0	0/0	0/1 (0%)
• adulti	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>R. bursa</i>						
• ninfe	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
• adulti	0/0	0/0	0/0	0/0	1/2 (50%)	1/2 (50%)
<i>R. sanguineus</i>						
• ninfe	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	
• adulti	0/0	0/0	0/0	0/0	1/7 (14,3%)	1/7 (14,3%)
<i>R. turanicus</i>						
• ninfe	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
• adulti	0/0	0/0	0/0	0/0	1/21 (4,7%)	1/21 (4,7%)
<b>Totale pos/tot %</b>	<b>5/48 (10,4%)</b>	<b>8/122 (6,6%)</b>	<b>10/67 (14,9%)</b>	<b>0/55 (0%)</b>	<b>10/68 (14,7%)</b>	<b>33/360 (9,2%)</b>

Tabella 6.7: Campioni di zecche esaminate (positivi/totale)

La prevalenza di *A. phagocytophilum* si è rivelata significativamente più elevata nel mese di aprile rispetto ai mesi di maggio e giugno ( $p < 0,05$ ). Nei mesi successivi il patogeno non è mai stato riscontrato ma il numero di zecche analizzate era molto basso (grafico 6.26).

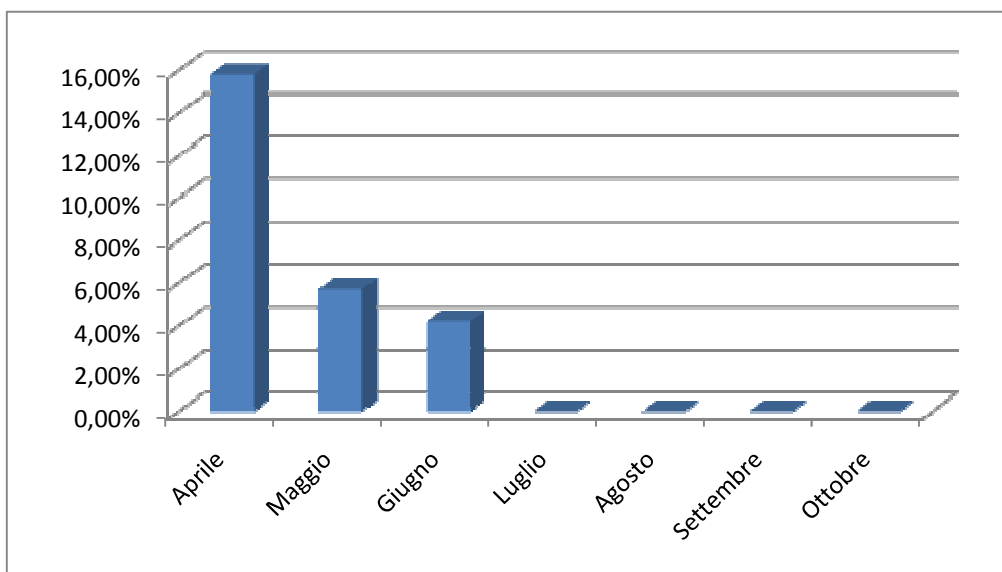


Grafico 6.26: Positività alla PCR per *A. phagocytophilum* in campioni di zecche raccolte dall'ambiente in diversi periodi dell'anno

La prevalenza di *Anaplasma* nelle zecche raccolte a 25-26 °C è risultata significativamente più elevata ( $p > 0,05$ ) rispetto alle prevalenze rilevate in zecche raccolte a temperature superiori o inferiori (grafico 6.27).

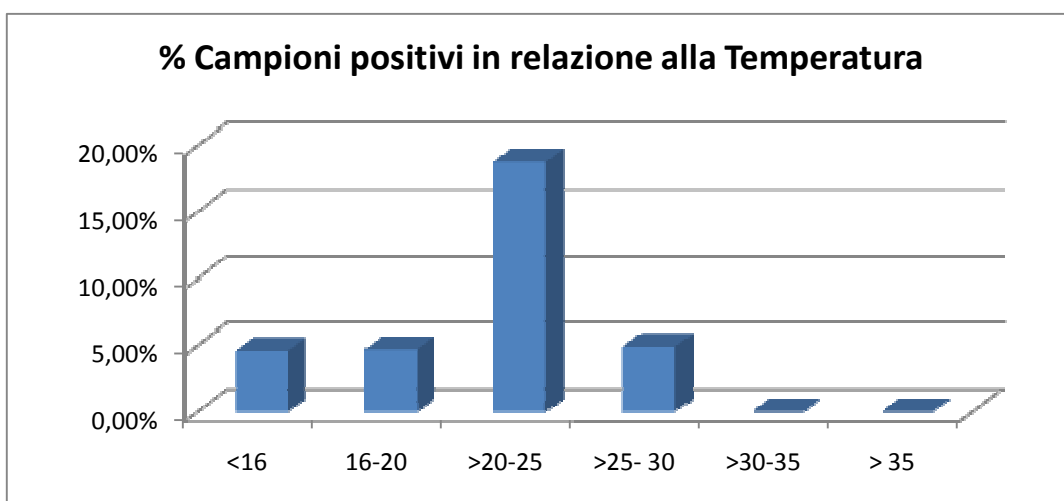


Grafico 6.27: Percentuale di positività alla real-time PCR per *A. phagocytophilum* dei campioni di zecche ambientali in relazione alla temperatura al momento della raccolta.

Non sono invece state evidenziate differenze significative di prevalenza in zecche raccolte a diversa percentuale di Umidità Relativa dell'aria (grafico 6.28).

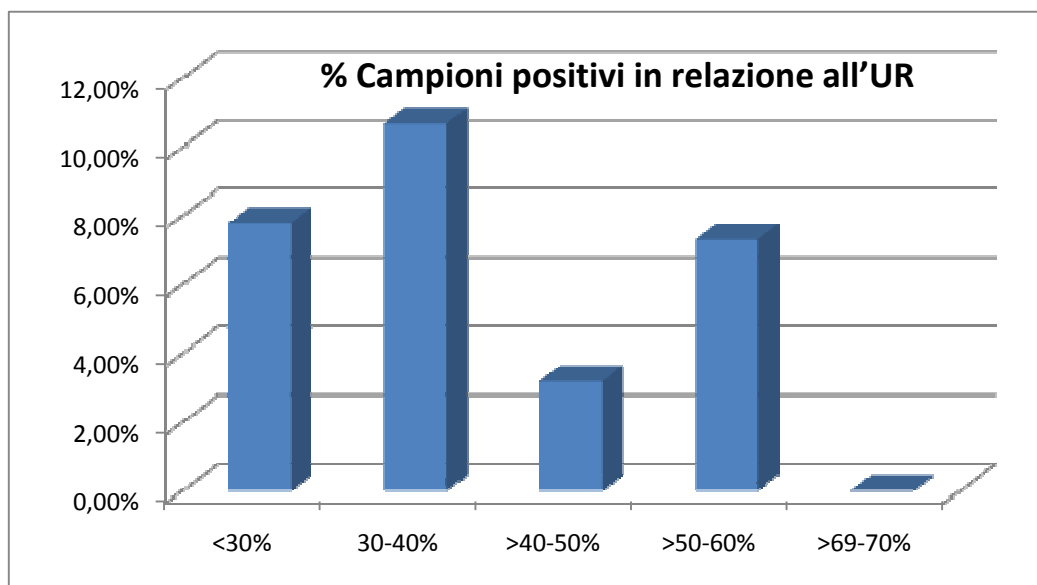


Grafico 6.28: Percentuale di positività alla real-time PCR per *A. phagocytophilum* dei campioni di zecche ambientali in relazione all'UR al momento della raccolta.

### 6.2.3 ANALISI FILOGENETICA

Ventisei campioni che presentavano Ct-value inferiore a 38 alla real-time PCR sono stati amplificati con NESTED-PCR per l'analisi del gene 23S-5S rRNA: 23 campioni hanno dato risultato positivo alla PCR. Di questi campioni 20 erano costituiti da zecche ambientali e 3 da zecche *I. ricinus* in fase di alimentazione, una sul cane e due sul gatto.

Le sequenze ottenute da questi 23 campioni sono state corrette, allineate e analizzate su BLAST permettendo così l'identificazione di 6 varianti del frammento di 248 bp ottenuto che differivano di poche basi nucleotidiche rispetto alle sequenze reperibili in GenBank per questo gene.

Confrontando i nostri ceppi con la sequenza di origine umana HZ (CP000235), abbiamo identificato 7 campioni (**gruppo A**) che differivano da questa per 3 variazioni nucleotidiche. A questo gruppo facevano capo 2 campioni provenienti da Monteveglio, 3 campioni da Ciagnano e due dalle zecche prelevate sul gatto. Altri 7 campioni (**gruppo B**) mostravano solamente due variazioni nucleotidiche. Tra questi, 3 isolati provenivano da Cà de Mandorli, 2 da Monteveglio, uno da Ciagnano e uno dalla zecca prelevata sul cane.

Il gruppo A è costituito dai campioni MV11, MV 21, CM 11, AN 10, AN 12, CG 104, CG 56, CG 21 e il gruppo B da: CM 38, CG 93, MV 3, AN 28, CG 110, CM 45, CM 14, MV 41.

Altri due isolati (CG39 e MV13) hanno presentato 3 variazioni nucleotidiche, diverse dalle precedenti; infine sono state identificate tre ulteriori varianti che differivano dal ceppo HZ per 1 nucleotide (CG26), 2 nucleotidi (MV19) e 3 nucleotidi (MV20) ciascuna.

Ogni variante è stata depositata su GenBank con numeri di accesso da JQ040534 a JQ040539.

In Tabella 6.7 sono riportati tutti gli isolati ottenuti in questo studio (evidenziati in grassetto) e le sequenze di 23S-5S rRNA disponibili in GenBank, utilizzate per le

analisi filogenetiche, evidenziando le differenze nucleotidiche riscontrate in ogni sequenza.

<u>Isolato (N. accesso))</u>	<u>Posizione nucleotidica</u>								
	Ospite	2787	2820	2842	2847	2853	2854	2861	2881
HZ (CP000235)	<i>Homo sapiens</i>	C	A	G	A	C	G	A	A
MRK (JF451139)	<i>Equus caballus</i>	*	*	A	*	*	*	*	G
<b>Group A (JQ040534)</b>	<i>Ixodes ricinus</i>	*	*	A	*	*	A	G	*
<b>Group B (JQ040535)</b>	<i>Ixodes ricinus</i>	*	*	A	*	*	A	*	*
<b>CG39/MV13 (JQ040536)</b>	<i>Ixodes ricinus</i>	T	*	A	*	*	A	*	*
<b>CG 26 (JQ040537)</b>	<i>Ixodes ricinus</i>	*	*	*	*	*	A	*	*
<b>MV 19 (JQ040538)</b>	<i>Ixodes ricinus</i>	*	*	A	*	T	*	*	*
<b>MV 20 (JQ040539)</b>	<i>Ixodes ricinus</i>	*	*	A	*	*	A	*	G
Nf (JF451141)	<i>Neotoma fuscipes</i>	*	*	A	*	*	*	*	*
Sg (JF451142)	<i>Sciurus griseus</i>	*	G	A	*	*	*	*	G

Tabella 6.7: Differenze nel 23S-5S rRNA di isolati di *A. phagocytophilum*; l'asterisco indica le basi uguali rispetto al ceppo di riferimento HZ.

Il filogramma ottenuto attraverso l'analisi ML del 23S-5S rRNA di *A. phagocytophilum* ha evidenziato che i nostri isolati clusterizzano con altri ceppi di origine statunitense disponibili in GenBank ottenuti da mammiferi e sono nettamente separati da un ceppo isolato da lucertola (JF487929), più correlato ad *Anaplasma marginale*.

Il clade in cui sono compresi i nostri isolati si presenta ulteriormente ripartito in funzione delle singole differenze nucleotidiche descritte in precedenza (Fig. 6.21).

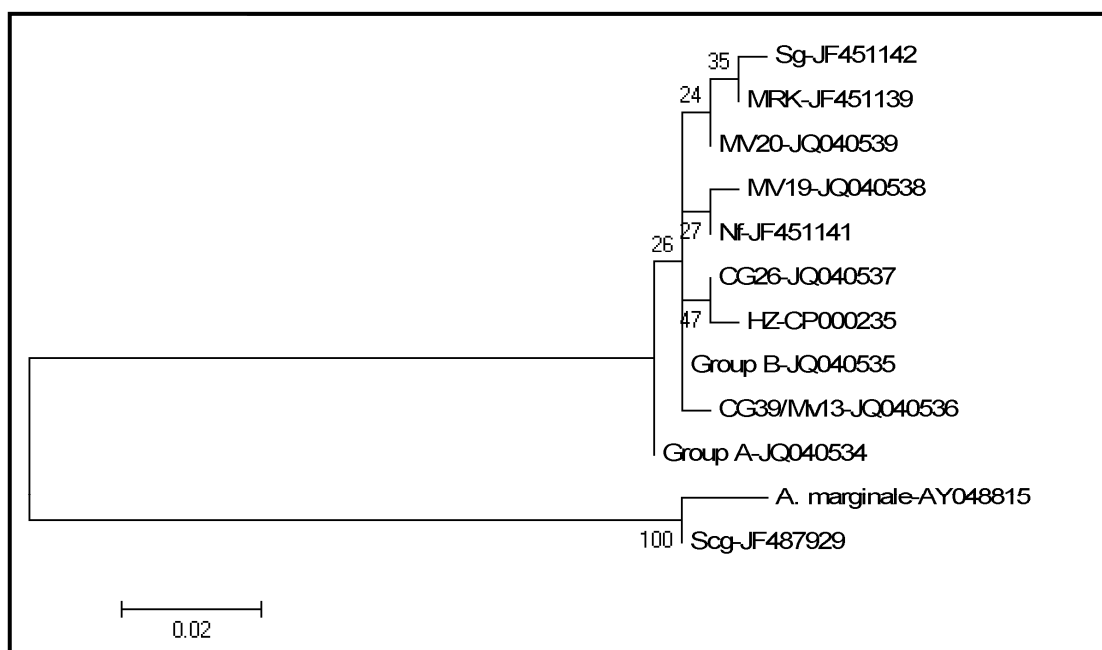


Figura 6.21: Analisi filogenetica di 23S-5S rRNA di *A. phagocytophilum*



Il gene *msp4* è stato amplificato in 8 campioni scelti sulla base della distribuzione filogenetica ottenuta dall'analisi del 23S-5S rRNA. Sono stati utilizzati i campioni AN10-CG104 (gruppo A), CM38-CG110 (gruppo B), CG26, MV 13, MV19 e MV20; solo 7 di questi hanno fornito sequenze idonee.

Sono state individuate due varianti del gene esaminato, successivamente depositate in GenBank (JQ068824 e JQ178338), differenziate da una singola sostituzione nucleotidica che però non determina una modifica nell'espressione della proteina codificata.

Le sequenze sono state allineate con altre sequenze dello stesso gene presenti in GenBank e l'analisi filogenetica condotta ha evidenziato che i nostri isolati si raggruppano in un cluster comprendente sequenze ottenute da ruminanti, specialmente caprioli e capre, isolate in diversi Paesi (Fig. 6.22).

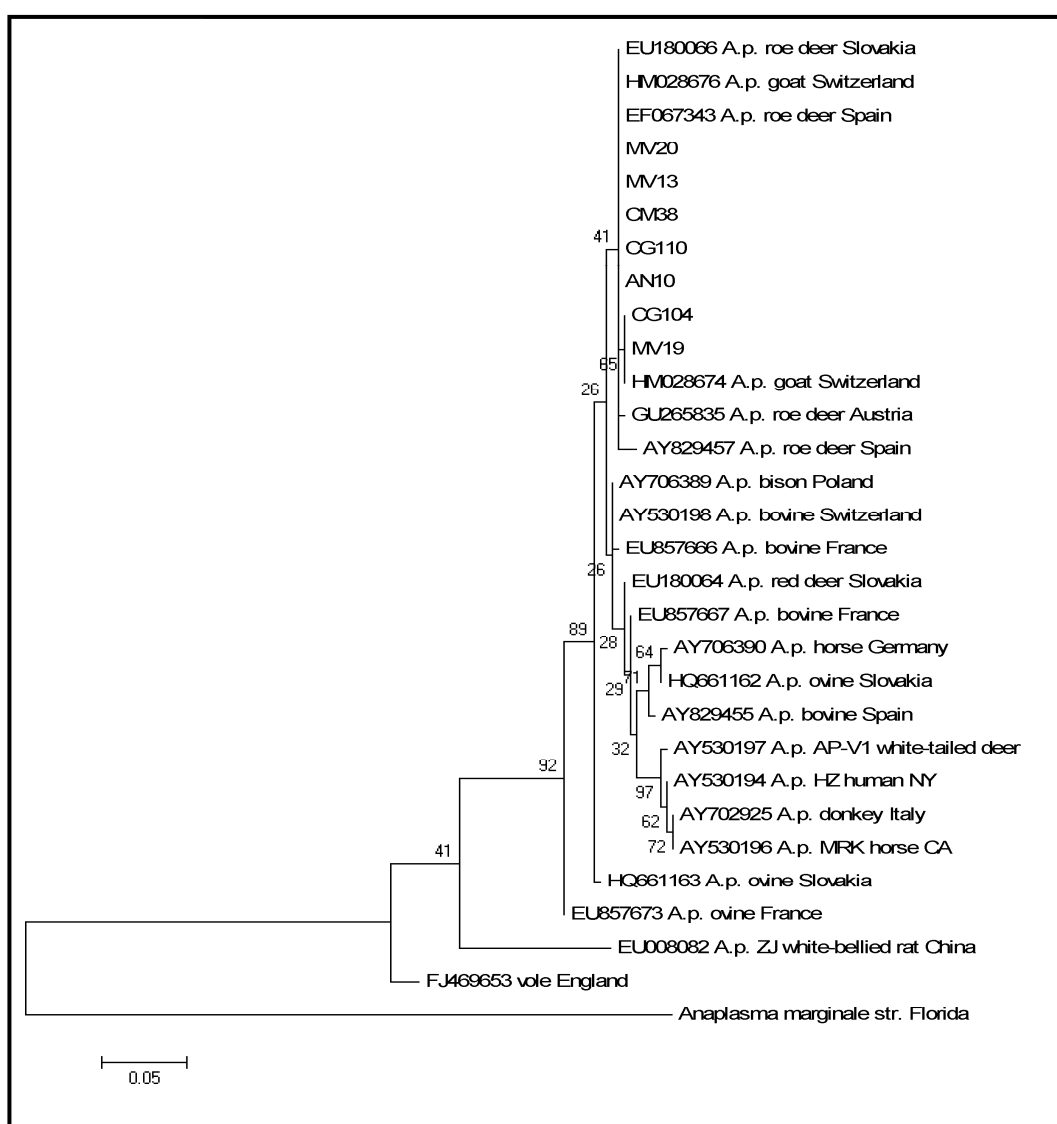


Figura 6.22: Analisi filogenetica di *msp4* di *A. phagocytophilum*

#### 6.2.4 RICERCA DI *BORRELIA BURGDORFERI* S.L.

La real-time PCR per la ricerca di *B. burgdorferi* s.l. è risultata positiva in 78 campioni di zecche su 360 (21,6%). I campioni positivi erano costituiti solo da zecche prelevate dall'ambiente, nello specifico 27 campioni provenivano dalla località Ciagnano, 18 dalla località Cà de Mandorli, 17 dal Parco di Monteveglio e 16 dal Parco del Carnè; non sono risultate differenze significative di positività in relazione ai diversi siti campionati. L'unica specie riscontrata positiva è *I. ricinus*. La descrizione dei campioni di zecche ambientali risultati positivi è riportata in tabella 6.8.

Campioni	Cà de Mandorli	Ciagnano	Monteveglio	Carnè	Totale
Pool di ninfe	17/43 (39,5%)	25/90 (27,8%)	14/56 (25%)	14/44 (31,8%)	70/233 (30%)
Femmine	1/2 (50%)	1/16 (6,2%)	1/4 25%	1/4 25%	4/26 15,4%
Maschi	0/3 0%	1/16 6,2%	2/7 28,5%	1/7 14,3%	4/33 12,1%
<b>Totale</b>	<b>18/48 37,5%</b>	<b>27/122 22,1%</b>	<b>17/67 25,4%</b>	<b>16/55 29,1%</b>	<b>78/292 26,7%</b>

Tabella 6.8: Campioni di zecche ambientali esaminate-positivi/totale (%)

Sul totale dei campioni, si osserva come le ninfe siano significativamente più infettate da *B. burgdorferi* s.l. rispetto agli adulti (30% vs 13,6%;  $p < 0,01$ ), mentre non è statisticamente significativa la differenza tra i vari siti di campionamento.

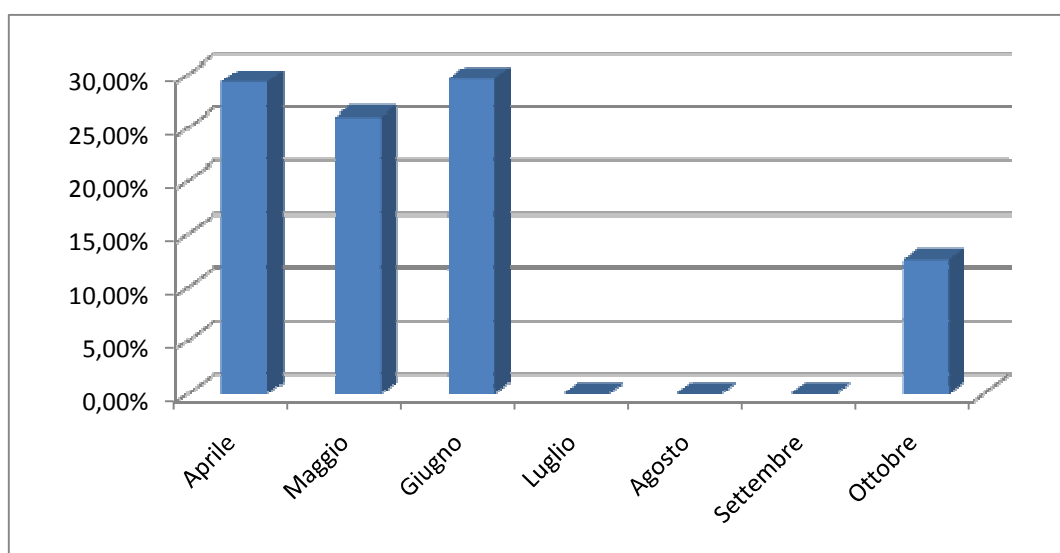


Grafico 6.29: Positività alla PCR per *B. burgdorferi* s.l. in campioni di zecche raccolte dall'ambiente in diversi periodi dell'anno

La prevalenza di *B. burgdorferi* s.l. nelle zecche è risultata più elevata nei mesi di Aprile, Maggio e Giugno, ma a causa dell'esiguità dei campioni esaminati negli

altri mesi, questa differenza non è risultata significativa (grafico 6.29).

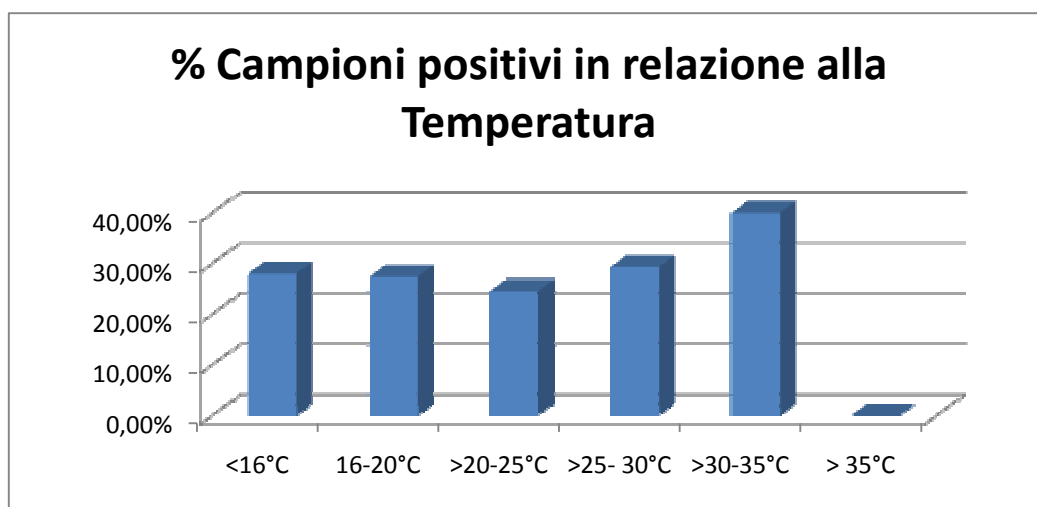


Grafico 6.30: Positività alla PCR per *B. burgdorferi* s.l. in campioni di zecche raccolte dall'ambiente in relazione alla temperatura al momento della raccolta

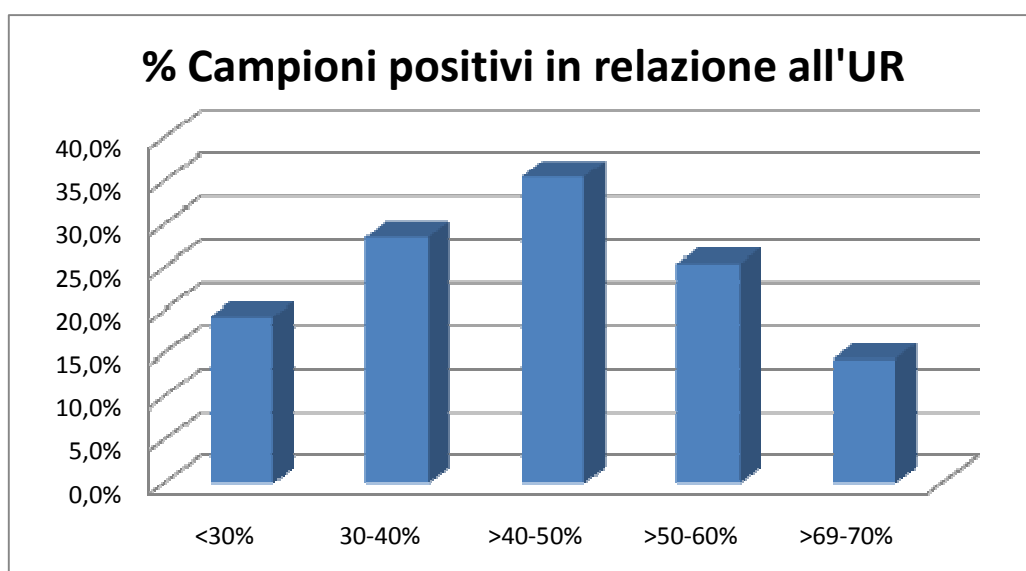


Grafico 6.31: Positività alla PCR per *B. burgdorferi* s.l. in campioni di zecche raccolte dall'ambiente in relazione all'UR al momento della raccolta

La prevalenza di *B. burgdorferi* non ha presentato differenze significative fra le zecche raccolte a diversi range di temperatura e Umidità Relativa (grafici 6.30, 6.31).

Su 58 campioni con Ct-value <38 è stata eseguita la PCR-RFLP. Sono stati analizzati 23 campioni di Ciagnano, 13 di Cà de Mandorli, 10 di Monteveglio e 12 del Carnè. Due campioni di Monteveglio hanno dato esito negativo. Con l'enzima MseI sono stati ottenuti 7 patterns definiti da lettere (A-G) (Fig. 6.23), mentre con l'enzima DraI sono stati evidenziati 6 patterns (a-f) (Fig. 6.24).

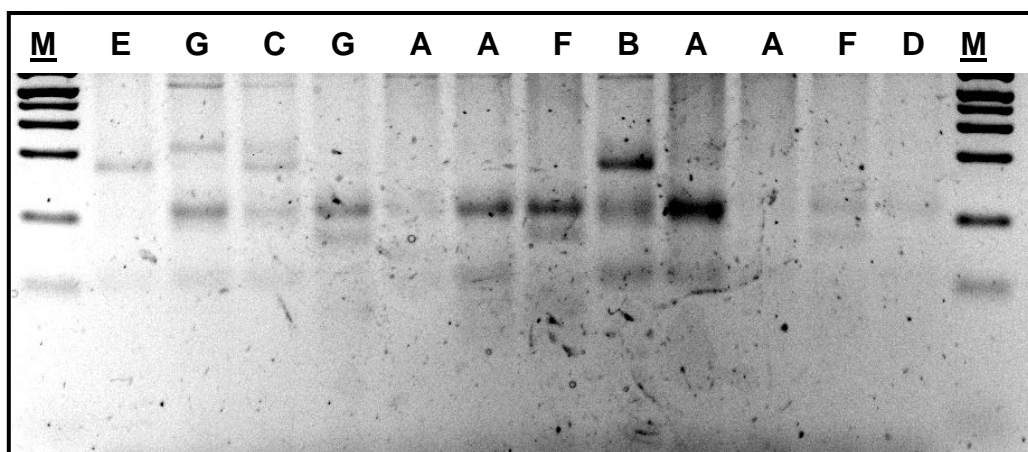


Figura6.23: Elettroforesi dopo digestione con enzima MseI (M=marker)

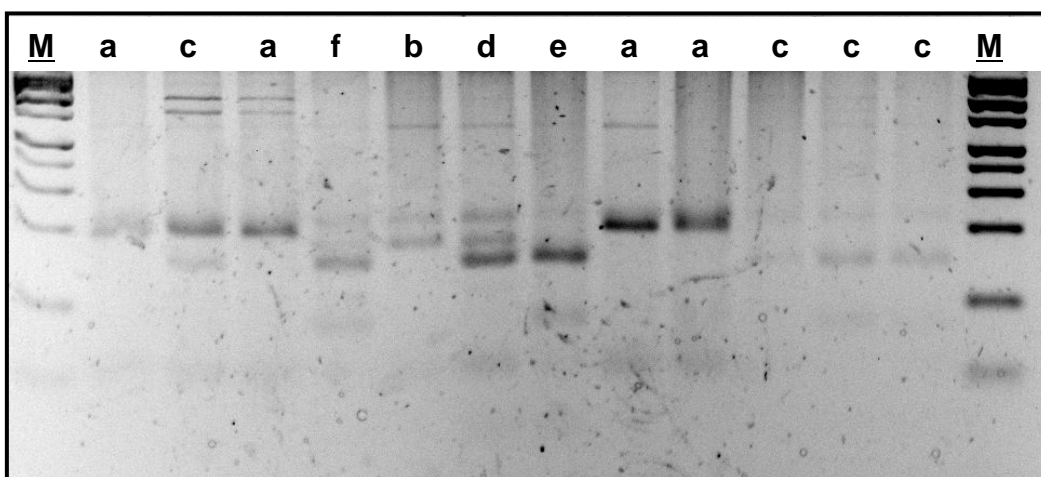


Figura 6.24: Elettroforesi dopo digestione con enzima DraI

L'analisi condotta ha permesso di identificare 12 diverse combinazioni dei patterns ottenuti. Da un campione per ogni combinazione è stato amplificato inizialmente il gene 23S-5S rRNA, ma sono state ottenute sequenze di scarsa qualità, tranne che per i campioni CM21 e CG24. È stato quindi deciso di effettuare una nuova amplificazione per il gene FlaB, per assegnare una genospecie ad ogni pattern, in seguito ad analisi su BLAST. Con il sequenziamento sono state identificate 5 genospecie. In Tabella 6.8 sono elencati i campioni risultati positivi, suddivisi in base al pattern ottenuto, per ciascuno dei quali è stata evidenziata la genospecie di appartenenza, con la percentuale di omologia verso le sequenze presenti in GenBank.

Genospecie (N. accesso-% similarità)	Pattern Msel	Pattern Dral	N (Campioni positivi)
<i>B. afzelii</i> (HM345909-100%)	A	b	7 (CM14, CG82, CG88, MV8, CR4, CR23, CR24)
<i>B. burgdorferi</i> JD1 (CP002312-99%)	A	c	2 (CR21, CR25)
<i>B. burgdorferi</i> s.s. (HM345911-100%)	E	d	7 (MV 52, MV54, MV56, CR3, CR18, CR26, CR48)
<i>B. burgdorferi</i> s.s. (AY772210-100%)	F	c	1 (CM21)
<i>B. burgdorferi</i> s.s. (HM345911-95%)	F	e	1 (CR8)
<i>B. garinii</i> (GU581274-99%)	A	a	16 (CM13, CM18, CG2, CG12, CG23, CG37, CG43, CG45, CG48, CG52, CG61, CG78, MV11, MV26, MV35, CR20)
<i>B. garinii</i> (HM802189-99%)	B	a	2 (CM43, CG20)
<i>B. garinii</i> AB091807-100%	C	a	3 (CG62, CG80, CG99)
<i>B. garinii</i> (JN828685-95%)	G	a	8 (CM26, CM37, CG14, CG31, CG110, MV63, MV33, MV66)
<i>B. lusitaniae</i> (GU581278 99%)	D	c	3 (CM7, CM17, CM36)
<i>B. lusitaniae</i> (GU581278-92%)	G	f	3 (CM47, CG50, CG96)
<i>B. valaisiana</i> (AF497985-95%)	E	a	3 (CG10, CG24, CR9)

Tabella 6.8: Patterns di PCR-RFLP individuati con gli enzimi Msel e Dral

Come si può osservare in tabella 6.8, quattro diversi patterns (Ac, Ed, Fc, Fe) ottenuti con gli enzimi di restrizione, erano riconducibili a *B. burgdorferi* s.s. però, tranne i patterns Ed e Fe, per i quali, nell'analisi di BLAST la maggiore percentuale di similarità era riferita allo stesso isolato, le sequenze ascrivibili agli altri 2 patterns avevano elevata similarità con isolati diversi fra di loro e dai precedenti. Quattro diversi patterns sono invece stati ascritti a *B. garinii* (Aa, Ba, Ca, Ga), ciascuno però con elevata similarità per un isolato diverso presente in GenBank. Gli isolati ascrivibili a *B. lusitaniae* presentavano invece 3 diverse combinazioni di patterns RFLP (Dc, Gg, Ea) e i primi due presentavano maggiore similitudine con uno stesso isolato presente in GenBank. Un solo pattern era riconducibile a *B. afzelii* e un altro a *B. valaisiana*.

### 6.2.5 COINFEZIONI ALL'INTERNO DELLE ZECCHIE

In 16 campioni di zecche è stata riscontrata la presenza di infezioni concomitanti.

Specie patogena	Cà de mandorli	Ciagnano	Monteveglia	Carnè
<i>A. phagocytophilum</i> / <i>B. burgdorferi</i> s.l.	CM11-ninfe CM38-ninfe	CG110-ninfe	MV11-ninfe MV21-maschio	CR48-maschio
<i>A. phagocytophilum</i> / <i>Babesia</i> EU1	CM23-ninfe	CG16-maschio	-	-
<i>B. burgdorferi</i> s.l./ <i>Babesia</i> EU1.	-	CG31-ninfe CG82-ninfe CG99-ninfe	-	-
<i>B. burgdorferi</i> s.l./ <i>B. divergens</i>	-	-	-	CR24-ninfe
<i>B. burgdorferi</i> s.l./ <i>Theileria</i> spp.	-	-	MV33-maschio MV36-ninfe MV40-ninfe MV45ninfe	-

Tabella 6.9: Campioni che presentavano coinfezioni

L'associazione *A. phagocytophilum*/*B. burgdorferi* s.l. si è rivelata la più frequente (6 campioni) ed è stata riscontrata in tutti i siti di campionamento, seguita dall'associazione *B.burgdorferi*/*Theileria* spp. (4 campioni), riscontrata solo nei campioni di Monteveglia. *Babesia* EU1 è stata riscontrata associata a *B. burgdorferi* s.l. in 3 campioni provenienti da Ciagnano e associata a *A. phagocytophilum* in 2 campioni provenienti da Cà de Mandorli e Ciagnano. Uno dei due campioni positivi per *B. divergens*, raccolto presso il Parco del Carnè, era positivo anche per *B. burgdorferi* s.l.

# **7**

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

## 7.1 DISTRIBUZIONE DELLE ZECCHIE

La distribuzione delle zecche Ixodidae in Italia è influenzata notevolmente dai diversi habitat che si susseguono nella nostra penisola, dalle Alpi all'estrema area del sud della Sicilia (Genchi e Manfredi, 1999). Molti studi relativi alla distribuzione delle differenti specie di zecche sono legati alla raccolta delle stesse su animali parassitati.

Negli ultimi anni, nell'opinione pubblica è aumentata la percezione di un incremento della diffusione delle zecche, con un'aumentata frequenza di infestazione anche nell'uomo.

Oltre ai cambiamenti climatici, all'aumento degli animali selvatici in aree rurali e periurbane, negli ultimi anni si è assistito anche ad un maggior interesse dell'uomo per le attività naturalistiche che lo hanno portato ad un più stretto contatto con gli ambienti silvestri in cui si compie il naturale ciclo della zecca. Il monitoraggio delle zecche, e di *I. ricinus* in particolare, nelle aree utilizzate dal pubblico per attività ricreative nel tempo libero, rende possibile una valutazione del rischio di infestazione da questi artropodi e di possibili infezioni da patogeni trasmessi (Kubiak e coll., 2006).

Per questa tesi sono stati effettuati campionamenti in quattro località situate in tre parchi naturali della regione Emilia Romagna, sui quali non vi erano studi precedenti. Il lavoro svolto ha permesso di evidenziare la presenza in questi territori di diverse specie di zecche Ixodidae. Oltre a *Ixodes ricinus*, che si è rivelata la specie più abbondante e di cui parleremo in seguito, nei campioni ambientali è stata evidenziata la presenza anche di *Scaphixodes frontalis*, *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma* spp. e *Ixodes acuminatus*, ai quali si aggiungono le zecche raccolte in fase di alimentazione su animali e uomo afferenti alle specie *I. ricinus*, *I. acuminatus*, *H. m. marginatum*, *H. detritum detritum*, *H. d. scupense*, *Rhipicephalus turanicus*, *R. bursa* e *R. sanguineus*. Anche tra le "feeding ticks" *I. ricinus* è stata riscontrata più frequentemente.

*S. frontalis* è una specie considerata endofila, nidicola, trifasica e monotropa che parassita essenzialmente le specie aviarie, soprattutto passeriformi (Manilla, 1998; Iori e coll., 2005). Questa zecca è stata trovata nei campionamenti ambientali in due località, Ciagnano e Parco del Carnè, in un numero limitato di esemplari ovvero una larva, 11 ninfe e una femmina. Il ritrovamento è avvenuto in ambienti congrui con quelli descritti per la specie, che viene segnalata con maggior frequenza in aree cespugliose con terreni coperti da foglie e humus (Iori e coll., 2005). *S. frontalis* viene segnalata in gran parte dell'Italia anche se finora non risultavano segnalazioni della sua presenza in Emilia Romagna (Manilla, 1998; Iori e coll., 2005). E' comunque da evidenziare come questa specie venga facilmente trasportata dagli uccelli durante le migrazioni. Tra le specie aviarie descritte come ospiti (Manilla, 1998) figurano la capinera (*Sylvia atricapilla*) e la sterpazzola, entrambe segnalate nelle località del campionamento.

Gli esemplari raccolti sono stati catturati nei mesi di aprile/maggio a Ciagnano e a maggio/giugno nel Parco del Carnè e non è stata rilevata la presenza di maschi, che comunque risultano raramente descritti in letteratura. Il ciclo biologico, la stagionalità e il ruolo patogeno di questa specie non sono ancora



completamente chiariti (Iori, 2005).

*Dermacentor marginatus* è una specie esofila, xerofila e ditropa, diffusa in quasi tutte le regioni d'Italia e nell'area mediterranea. Gli stadi immaturi sono endofili e si nutrono soprattutto su piccoli mammiferi, come roditori, alcuni carnivori di medie dimensioni e anche su uccelli (Estrada-Peña e coll., 2004), mentre gli adulti si nutrono principalmente su ruminanti domestici e su ungulati selvatici (Iori e coll., 2005). Un esemplare adulto di *D. marginatus* è stato rinvenuto nella zona di Cà de Mandorli in un *transect* con un terreno ricoperto da erba in prossimità di un'area frequentata da cinghiali; in località Ciagnano, sempre nel mese di maggio, sono state raccolte 36 larve di questa specie, in un *transect* caratterizzato da un terreno in cui era presente un tappeto erboso esposto al sole. Anche in questa zona durante il campionamento abbiamo trovato chiari segni della presenza di cinghiali. Il ritrovamento in queste zone concorda con quanto segnalato in letteratura in riferimento a questa specie di Ixodidae: infatti Iori e coll. (2005) descrivono un habitat con querceti aperti, aree arbustive e pascoli, tipologia che possiamo in parte paragonare ai *transects* di ritrovamento per questa zecca. Inoltre è segnalato come in Italia centrale questa zecca sia strettamente associata al cinghiale (Manilla, 1998), la cui presenza è stata riscontrata nelle nostre aree di cattura. Tra le specie segnalate come ospiti troviamo anche altri mammiferi presenti nei parchi campionati, tra cui la volpe, la donnola, il lupo, la lepre e il capriolo.

Per quanto riguarda il genere *Hyalomma*, gli esemplari adulti da noi reperiti (1 maschio e 2 femmine), in località Ciagnano, sono risultati appartenenti alla sottospecie *Hyalomma marginatum marginatum*, mentre per le larve (3 esemplari), trovate nella stessa località, non è possibile risalire alla specie in quanto in questo stadio di sviluppo non sono presenti caratteristiche distintive (Manilla, 1998).

*Hyalomma m. marginatum* è una specie considerata endo-esofila, di-trifasica, mono-ditropa con stadi immaturi che possono essere ospitati da una vasta gamma di mammiferi e uccelli, mentre gli adulti, che sono attivi dalla primavera all'autunno, preferiscono artiodattili (suini, cervi, caprioli, bovini e capre) e perissodattili (cavalli e asini), ma possono anche attaccare l'uomo. È segnalata in tutta Italia, anche se è stata più frequentemente ritrovata nelle regioni meridionali (Manilla, 1998; Iori e coll., 2005). È considerata una specie ad ampia plasticità ecologica diffusa in tutti gli ambienti, come in pascoli aridi o umidi o in piena macchia mediterranea (Iori e coll., 2005).

In questo lavoro questa specie è stata rinvenuta sia nell'ambiente, sia su animali (cavalli). Per quanto riguarda l'ambiente, è stata riscontrata limitatamente alla località Ciagnano, dove gli esemplari sono stati rinvenuti in due *transects* caratterizzati da micro-habitat tipo sottobosco, con foglie secche e humus. Nella zona sono presenti numerosi animali segnalati come ospiti abituali, quali capriolo, cinghiale (*Sus scrofa*), lepre, assiolo, poiana, fagiano, sterpazzola, tortora, succiacapre, averla piccola (*Lanius collurio*), usignolo (*Luscinia megarhynchos*), capinera, merlo (*Turdus merula*), gazza, allodola (*Alauda arvensis*) e upupa (*Upupa epops*).

I soggetti prelevati in fase di alimentazione sul cavallo, residente nel Parco dei Gessi, erano due maschi e una femmina.

Sono stati campionati anche altri due esemplari appartenenti al genere

*Hyalomma*, nello specifico un maschio di *H. detritum detritum* e uno di *H. detritum scupense*. Anche queste zecche sono state raccolte in fase di alimentazione su cavalli. In Italia sono state segnalate principalmente nelle regioni meridionali, in particolare in Puglia sono state rinvenute entrambe (Iori e coll., 2005).

*Ixodes acuminatus*, di cui sono state reperite 2 femmine in località Ciagnano, 1 maschio nel parco del Carnè e un altro maschio in fase di alimentazione su un cane, è una specie endofila, trifasica e monotropa o mono-ditropa

E' considerata strettamente legata ai suoi ospiti e alle loro tane: micromammiferi, sia insettivori che roditori, spesso mustelidi e anche carnivori come la volpe; recentemente è stata reperita anche sull'uomo (Iori e coll., 2005). A Ciagnano si registra la presenza di vari mustelidi tra cui la faina, il tasso e la donnola che rappresentano, per gli stadi adulti, l'ospite più frequentemente parassitato. Nella nostra indagine, è stata trovata in zone caratterizzate da un habitat tipico del sottobosco, con terreno ricoperto da foglie secche, piante rampicanti e da arbusti.

Il genere *Rhipicephalus* comprende circa 60 specie, molte delle quali hanno un ciclo a tre ospiti e alcune a due ospiti (Giangaspero e Otranto, 2010).

Nel nostro studio sono stati rinvenuti due esemplari di *R. bursa*: un maschio raccolto su un bovino e una femmina ingorgata prelevata da un cane. È una zecca a tre ospiti e infesta principalmente bovini, ovini, equini, cani e uccelli. È diffusa nell'Africa sub-Sahariana e in sud Europa. In Italia, in precedenza, è stata rinvenuta principalmente nelle regioni centro-meridionali, con una segnalazione in Emilia Romagna (Canestri-Trotti e Corradini, 1986).

*R. sanguineus*, chiamata anche zecca bruna del cane, parassita appunto il cane ma anche altri mammiferi e a volte gli uccelli. È la zecca più diffusa al mondo. È una specie trifasica ed endofila, al contrario delle altre specie appartenenti al genere *Rhipicephalus* tendenzialmente esofile, e sopravvive abbastanza bene anche nei canili e nelle case (Giangaspero e Otranto, 2010). Nei campionamenti effettuati sugli animali sono stati raccolti 5 maschi e 2 femmine, tutti su cani.

*R. turanicus* è una zecca trifasica e ditropa; le forme immature parassitano generalmente i roditori, i lagomorfi e gli insettivori, mentre gli adulti si alimentano generalmente su caprini, ovini, bovini, equidi, meno frequentemente sui cani e altri carnivori (Manilla, 1998). Ventuno soggetti appartenenti a questa specie sono stati prelevati in fase di alimentazione: 19 sono stati raccolti su cavalli, mentre due sono stati prelevati su un cane e su una persona rispettivamente. In Italia questa zecca è descritta primariamente nelle regioni del sud, anche se alcune segnalazioni riguardano la Liguria (Manilla, 1998) e recentemente l'Emilia Romagna (Iori e coll., 2010). Probabilmente per il fatto che in passato era stata confusa con *R. sanguineus*, non si può escludere che la distribuzione possa essere più ampia di quanto pensato finora.

*Ixodes ricinus* è sicuramente la specie più diffusa in Italia; Genchi e Manfredi (1999) ne indicano una elevata abbondanza nelle regioni del nord Italia e Frusteri e coll. (1994) hanno rilevato come in un parco in provincia di Roma *I. ricinus* fosse la specie maggiormente rappresentata.

Anche nella nostra indagine risulta essere la specie predominante, con 8080 esemplari catturati dall'ambiente e 37 prelevati da animali o persone.

Questa specie è endo-esofila, trifasica e ditropa, con bassissima specificità;

solitamente gli stadi immaturi colpiscono micromammiferi, ma anche uccelli e rettili; le ninfe e gli adulti sono frequentemente associati agli ungulati selvatici e a mammiferi di medie e grandi dimensioni (Manilla, 1998); anche l'uomo viene aggredito con facilità. In questa indagine oltre all'uomo, gli animali su cui è stata rinvenuta durante i nostri campionamenti sono cani, gatti e cavalli.

Questa specie è stata segnalata in tutte le località di campionamento, anche se si sono notate variazioni dell'IA collegate al periodo di raccolta, stadio di sviluppo, microclima (temperatura e umidità) e vegetazione sul sito di campionamento.

Valutando l'abbondanza complessiva delle zecche durante l'intero periodo di campionamento e sul totale dei siti campionati si è evidenziata una maggior abbondanza relativa allo stadio larvale ( $891,3/100 \text{ m}^2$ ) rispetto alle ninfe ( $150,9/100 \text{ m}^2$ ) e soprattutto agli adulti ( $7,1/100 \text{ m}^2$ ). Risultati analoghi in termini di una maggior presenza degli stadi immaturi sono stati osservati anche da Barandika e coll. (2010) nel nord della Spagna, mentre la maggior parte della recente letteratura prende in considerazione solo gli stadi ninfali e adulti. Una minor presenza degli stadi maturi, rispetto alle forme giovanili, può essere legata al fatto che delle migliaia di uova prodotte dalla femmina solo lo 0,1% può raggiungere lo stadio adulto (Wilson, 1994), quindi una minor presenza di forme ninfali e adulte può essere considerata fisiologica. Valutando i diversi siti di campionamento si può osservare come a Ciagnano si sia registrato un indice di abbondanza medio significativamente più elevato rispetto alle altre località. Questa zona è anche caratterizzata da una maggior varietà di specie di Ixodidae, condizione che probabilmente è legata alla presenza sul territorio di una fauna variegata e ricca, probabilmente maggiore rispetto agli altri siti di raccolta.

Durante il periodo di campionamento, indipendentemente dallo stadio di sviluppo, si può notare come nel mese di luglio si sia registrata la massima abbondanza di zecche. Un altro picco di raccolta, anche se molto inferiore, si è osservato nel mese di maggio.

Valutando l'andamento stagionale dei diversi stadi di sviluppo, per quanto riguarda le larve il maggior indice di abbondanza è stato riscontrato nel mese di luglio nei due siti di raccolta del Parco dei Gessi e a Monteveglio, anche se in quest'ultimo sito è evidente un precedente picco, di entità inferiore, nel mese di maggio. Per quanto riguarda il Parco del Carnè, il maggior IAL è stato osservato nei campionamenti del mese di agosto. In tutte le aree di campionamento, il maggior IAN è stato riscontrato nel mese di maggio, precedendo così il picco delle larve, anche se a Monteveglio, in corrispondenza del picco delle ninfe in maggio, è presente anche un aumento di abbondanza delle larve. In accordo con i nostri risultati, Randolph e coll. (2002) in uno studio analogo condotto in Inghilterra dal 1996 al 2001, hanno evidenziato come, anche se con differenze annuali, le larve mostrano un maggior picco intorno al mese di luglio, mentre le ninfe mostrano una maggior attività nel mese di maggio, a differenza di quanto segnalato da Barandika e coll. (2010) nel nord della Spagna. Questi ultimi autori avevano evidenziato un *pattern* di attività bimodale (con 2 picchi in maggio/luglio – autunno) per quanto riguarda le larve, mentre per le ninfe evidenziavano picchi stagionali differenti tra i diversi siti di campionamento.

Nel nostro lavoro il riscontro di soggetti adulti è risultato invece piuttosto sporadico e distribuito durante tutto l'arco dei campionamenti. L'IAA in totale è risultato pari a  $7,1/100 \text{ m}^2$ , in linea con quanto riscontrato da Barandika e coll.

(2010) che evidenziavano abbondanze totali variabili da 1,4 a 14,3/100 m<sup>2</sup> a seconda dell'anno e del sito di campionamento.

Sono stati valutati i dati macroclimatici utilizzando i dati raccolti dalle centraline dell'ARPA, situate in zone vicine alle aree di campionamento per controllare se durante il periodo di indagine, nelle diverse località scelte, si fossero presentate variazioni macroclimatiche (temperatura e umidità) tali da giustificare i diversi IAL ottenuti. Poiché non si sono registrate differenze importanti abbiamo escluso dalle nostre considerazioni la variabile macroclimatica, considerando solo la temperatura e l'umidità registrate a 5 cm dal suolo durante i campionamenti nei diversi *transects* (microclima).

Nell'ambito del range di temperatura riscontrato durante il periodo di campionamento è stato osservato come l'IAL tende ad aumentare al crescere della temperatura, in particolare una maggior abbondanza è stata riscontrata per temperature  $\geq 30^{\circ}\text{C}$ ; viceversa l'IAN e l'IAA tendono a calare al crescere della temperatura, con il picco massimo fra i  $18^{\circ}\text{C}$  e i  $22^{\circ}\text{C}$ . Gli adulti non sono mai stati trovati a temperature  $\geq 30^{\circ}\text{C}$ .

I dati rilevati per le ninfe concordano con altri lavori presenti in letteratura che segnalano un aumento del numero di zecche raccolte con il metodo del *flagging* fino a temperature di  $24^{\circ}\text{C}$  (Perret e coll., 2000), mentre temperature al di sopra dei  $24^{\circ}\text{C}$  causano una diminuzione del numero di zecche attive (Martin e coll., 1990). Kubiak e Dziekonska-Rynco (2006) in Polonia, segnalano la minore attività delle zecche proprio nei periodi estivi, quando la temperatura è più elevata. Non abbiamo trovato dati in letteratura che possano giustificare l'aumento del IAL al crescere della temperatura riscontrato nel nostro studio, in particolare per temperature superiori a  $30^{\circ}\text{C}$ . Gli stadi larvali sono normalmente considerati più sensibili alle alte temperature e vari autori segnalano come le temperature di  $32^{\circ}\text{C}$  siano considerate critiche per la sopravvivenza di *I. ricinus*, in quanto provocano una rapida disidratazione (Balashov, 1972). Solitamente l'umidità viene infatti considerata un fattore cruciale per la sopravvivenza di *I. ricinus*, perciò larve e ninfe scelgono micro-habitat in cui l'umidità relativa è per lo più superiore all'80% per evitare l'essiccamento (Anderson e Magnarelli, 2008). È descritto come normalmente le zecche in attiva ricerca dell'ospite, in conseguenza alla disidratazione tendono a scendere negli strati più superficiali del suolo, sotto al fogliame o alla base della vegetazione, dove si crea un microclima ad alta umidità che ne permette la reidratazione (Sonenshine, 1993). Le giovani zecche una volta reidratate e affamate tendono a risalire sugli strati superficiali del tappeto erboso o sugli strati di foglie del sottobosco presentando un'elevata attività di ricerca dell'ospite (Jensen, 2000). Il fatto che in questa tesi sia stato osservato come l'abbondanza delle larve tende a decrescere all'aumentare dell'umidità, anche se le differenze non sono significative, evidenziando il maggior IAL in momenti in cui l'umidità rilevata a 5 cm dal suolo era inferiore a 35%, può essere spiegato col fatto che le zecche raccolte con il campionamento mediante *flagging* sono quelle in attiva ricerca dell'ospite e che questa attività aumenta appunto quando l'umidità dell'aria è bassa (Jensen, 2000).

Per le ninfe e per gli adulti si riscontra un andamento altalenante, ma abbastanza costante, di differenti range di umidità registrate.

Considerando la vegetazione presente nei vari *transects* di raccolta è stato

possibile osservare come per *I. ricinus* in genere, e in particolare per le larve e le ninfe, la maggior abbondanza sia stata riscontrata in aree di sottobosco dove il manto erboso non era presente e si riscontrava una vegetazione con piccoli arbusti e soprattutto con terreno ricoperto da foglie secche. Sebbene pascoli e prati siano considerati idonei per la presenza di *I. ricinus* in alcuni paesi europei quali Gran Bretagna, Irlanda, Repubblica Ceca, Slovacchia e Austria, esse sono quasi assenti nelle zone di pascolo ed è l'habitat legato al sottobosco che ne favorisce la sopravvivenza. In particolare le forme immature sono meno frequenti nei pendii assolti delle aree collinari (Sonenshine, 1993). I dati da noi ottenuti possono quindi essere spiegati con il fatto che le aree che presentavano un manto erboso erano anche le più esposte al sole, questo probabilmente limitava la presenza di zecche attive negli strati più superficiali, diminuendo l'attacco delle stesse ai teli di raccolta.

## 7.2 RICERCA DI PATOGENI TRASMESSI DALLE ZECCHIE

**Piroplasmii:** dei 393 campioni esaminati in questa ricerca, il 7,6% è risultato positivo per piroplasmii. Le positività sono state riscontrate solo in zecche adulte o in ninfe.

Prevalenze inferiori a quelle da rilevate in questo studio, sono state segnalate da Reye e coll. (2010) in Lussemburgo, che hanno riscontrato una percentuale di zecche positive per *Babesia* sp. del 2.7%. In Slovenia Duh e coll. (2005b) hanno ottenuto livelli di prevalenza simili a questi ultimi (2.2%), mentre in un lavoro precedente avevano osservato una positività del 9.6% (Duh e coll., 2001). Altre ricerche svolte in Svizzera ed in Germania hanno riportato rispettivamente una prevalenza media dello 0.8% (da 0.7 a 1.7%) (Casati e coll., 2005) e dell'1% (Hartelt e coll., 2004).

Fra i vari paesi europei, il maggior numero di ricerche è stato riscontrato in Polonia, dove sono stati osservati tassi d'infezione delle zecche diversi a seconda della zona di campionamento. Le percentuali rilevate sono del 16.3% nel lavoro di Skotarczak e Cichocka (2001) e del 6.2% nel lavoro di Skotarczak e coll. (2002). Livelli molto elevati di prevalenza, quasi il 60%, sono stati segnalati da Kuźna-Grygiel e coll. nel 2002, mentre Pieniążek e coll. (2006) hanno invece rilevato il 2% di positività. Questi dati sono relativi al Nord-Ovest del paese, a differenza della percentuale del 3.52% riportata da Wójcik-Fatla e coll. (2009) nel Sud-Est della Polonia.

Altre ricerche hanno rilevato percentuali di positività nettamente superiori alla nostra, come lo studio condotto in Austria da Blaschitz e coll. (2008), in cui la prevalenza riscontrata è stata del 51.7% e una ricerca eseguita in Svizzera nel 2002 (da zecche raccolte nel Luglio 1997) in cui è risultata una prevalenza del 21.87% (Foppa e coll., 2002).

I dati presenti in letteratura evidenziano quindi livelli di positività molto variabili a seconda delle aree campionate; alcuni dati però potrebbero non essere direttamente confrontabili in quanto sono state utilizzate tecniche di rilevamento diverse, come ad esempio la ricerca degli sporozoi direttamente nelle ghiandole salivari (Kuźna-Grygiel e coll., 2002) o diverse metodiche di PCR.

Anche in questo studio sono stati rilevati livelli di positività diversi a seconda delle

zone campionate ed in particolare una prevalenza d'infezione nelle zecche significativamente maggiore è stata riscontrata a Monteveglio, probabilmente perché le aree campionate costituiscono una nicchia favorevole al mantenimento del ciclo biologico del parassita. In concordanza con quanto osservato dagli altri autori, anche le positività da noi rilevate sono state evidenziate solo in zecche appartenenti alla specie *Ixodes ricinus*; come già descritto in precedenza questa specie di zecca è la più comune ed ampiamente diffusa in Europa e rappresenta il vettore di molti patogeni (Pieniżek e coll., 2006).

Prendendo in considerazione il periodo in cui sono stati effettuati i campionamenti, la maggior prevalenza è stata evidenziata in Maggio, anche se le differenze tra i diversi periodi dell'anno non erano significative. Alcuni autori hanno indicato prevalenze maggiori in settembre (Reye e coll., 2010) o in Giugno ed Ottobre (Kuźna-Grygiel e coll., 2002). Nel nostro studio non sono state rilevate positività nei mesi autunnali; questo risultato potrebbe essere spiegato da un minor numero di zecche ritrovate nell'ambiente, con una conseguente minore probabilità di riscontrare campioni positivi.

Le ninfe sono risultate più frequentemente infette degli adulti e delle larve (tutte negative); queste differenze però non sono significative da un punto di vista statistico. Al contrario, in Polonia (Kuźna-Grygiel e coll., 2002), gli adulti hanno mostrato livelli di positività maggiori rispetto alle ninfe; queste ultime rivestono comunque il principale ruolo nella diffusione dei patogeni, dato il loro numero più elevato.

Nei nostri risultati non si riscontrano differenze significative di positività in relazione al sesso delle zecche adulte; in un lavoro svolto in Lussemburgo, le femmine hanno invece mostrato una prevalenza d'infezione molto più elevata rispetto ai maschi (rispettivamente 26,7% e 19,7%) (Reye e coll., 2010).

Anche in relazione ai valori di temperatura ed umidità riscontrati durante le fasi di campionamento del nostro lavoro, le differenze non sono risultate significative.

Quest'osservazione non trova riscontri analoghi in letteratura; i dati principali, infatti, riguardano l'incidenza delle infezioni legata alla maggior attività delle zecche e non alla positività dei vettori. Clarke e coll. (1989) ad esempio, hanno evidenziato che la maggiore incidenza delle infezioni da *B. divergens* nei bovini avviene quando le temperature ambientali sono elevate, ovvero quando le zecche sono più attive, con un conseguente andamento stagionale della malattia. Studi precedenti di Gray (1980) avevano invece dimostrato come la temperatura, una volta superata la soglia minima di attivazione delle zecche, abbia un effetto minimo sull'andamento della piroplasmosi.

Le specie di piroplasma da noi identificate tramite sequenziamento dei campioni positivi sono tre: *Babesia EU1*, *Babesia capreoli/divergens* ed il complesso *Theileria buffeli/sergenti/orientalis*.

Gli isolati di *Theileria* appartenenti a quest'ultimo complesso di specie non sono distinguibili sulla base dell'analisi del frammento da noi amplificato, compreso nel 18S rRNA, una regione molto conservata del genoma dei piroplasma. Per poterle distinguere si potrebbero studiare tratti di genoma diversi, come ad esempio quello della Proteina di Superficie Maggiore dei Piroplasma (p33/34), sfruttata nel lavoro svolto da Kawazu e coll. (1998).

Questo complesso di specie è comunque considerato poco patogeno per gli

animali sensibili (ruminanti domestici e selvatici) e ciò, unitamente all'assenza di potere zoonotico, ha fatto sì che l'attenzione verso questo gruppo di parassiti sia scarsa. Queste specie non rappresentano un rischio rilevante per la salute dei bovini italiani, come confermano precedenti segnalazioni relative ad esse (Savini e coll., 1998; Cassini e coll., 2012), ma potrebbero dare problemi interferendo nella diagnosi di specie più patogene come *T. annulata* (Savini e coll., 1998).

Nel presente lavoro la presenza di questo complesso di specie è stata rilevata in tutti i siti di campionamento, ad eccezione del Parco del Carné, e in due zecche prelevate in fase di alimentazione. La località di Monteveglio ha mostrato un'elevata percentuale di positività. In questa zona non sono presenti bovini al pascolo, per cui probabilmente, il serbatoio del luogo potrebbero essere alcuni ruminanti selvatici. In questi animali, in Italia, queste specie non sono ancora state segnalate, mentre Tampieri e coll. (2008) hanno evidenziato la presenza di altre specie di *Theileria* quali *Theileria* sp. OT3 e *T. capreoli*. Le "feeding ticks" risultate positive per *Theileria* spp. appartenenti al complesso *buffeli/sergenti/orientalis* erano due adulti afferenti alle specie *I. ricinus* e *H. m. marginatum* e sono state raccolte rispettivamente su cane e su un cavallo. Non avendo potuto esaminare il sangue di questi soggetti non è possibile stabilire se gli animali infestati fossero essi stessi positivi (peraltro nel cane e nel cavallo non è segnalata la presenza di questi piroplasmii) oppure se le zecche fossero già infette in seguito ad un pasto precedente.

Per quanto riguarda l'analisi filogenetica degli isolati, si nota la particolarità del fatto che le sequenze ottenute da campioni provenienti dalla stessa località sono molto simili, se non identiche, tra di loro, mentre sono differenti in relazione al luogo di campionamento.

*Babesia divergens/capreoli*: sono specie che infestano essenzialmente i ruminanti selvatici e il bovino nel caso di *B. divergens* (Zintl e coll., 2003), come segnalato in letteratura (Duh e coll., 2005b; Hoby e coll., 2007; Tampieri e coll., 2008). Negli isolati ottenuti, entrambi riscontrati in zecche provenienti dal Parco del Carné, non è stato possibile discriminare tra la specie *B. capreoli* e *B. divergens*, in quanto l'analisi molecolare del 18S-rRNA non permette di distinguerle, come riportato anche da altri Autori (Garcia-Sammartin e coll., 2007). Le sequenze da noi ottenute sono risultate identiche tra loro.

La segnalazione di *Babesia* EU1, chiamata anche *Babesia venatorum*, è quella che riveste una maggior importanza; è stata segnalata in tutti i siti di campionamento, con una prevalenza totale del 3,4% ed in particolare il maggior tasso d'infezione è stato riscontrato in zecche raccolte nella località di Ciagnano (5,56%).

Tutte le sequenze da noi isolate sono identiche fra loro e bastano al 100% con diversi ceppi di *Babesia* EU1, tra cui anche quello segnalato da Cassini e coll. (2010) in Veneto, sempre da zecche e l'isolato dal caso umano segnalato da Herwald e coll. (2003) sulle colline dell'Appennino forlivese. Questo caso riguardava un cacciatore splenectomizzato che presumibilmente aveva contratto l'infezione durante le battute di caccia sulla dorsale appenninica che costituisce il proseguimento verso est del tratto oggetto di campionamento.

Questa specie è stata isolata per la prima volta da due casi umani, uno austriaco ed uno italiano (Herwald e coll., 2003), mentre successivamente è stata isolata anche da caprioli in Slovenia (Duh e coll., 2005a), in Francia (Bonnet e coll.,

2007) ed in Italia nella provincia di Verona (Tampieri e coll., 2008). L'isolamento da zecche, in particolare *Ixodes ricinus*, si è avuto in Slovenia (Duh e coll., 2005b), Svizzera (Casati e coll., 2006; Hilpertshauser e coll., 2006), in Austria (Blaschitz e coll., 2008), in Lussemburgo (Reye e coll., 2010), ed in Italia in Veneto (Cassini e coll., 2010).

*Babesia* EU1 sta riscontrando un sempre maggiore interesse, in quanto agente eziologico di una zoonosi emergente trasmessa da zecche; quello che viene considerato il suo principale vettore, *Ixodes ricinus*, è infatti ampiamente diffuso in Europa e molto spesso attacca anche l'uomo, aumentando così la possibilità di trasmissione.

Questa specie di *Babesia* non è in realtà molto patogena per l'uomo e la sintomatologia clinica sembra manifestarsi principalmente in soggetti splenectomizzati, immunodepressi o anziani, causando però sintomi di lieve entità. Non si può però escludere la presenza di infezioni asintomatiche, che possono portare a sottostimare la sua reale diffusione; ad oggi infatti i casi segnalati di babesiosi umana sostenuti da *Babesia* EU1 sono pochi.

Questa specie ha un alto grado di correlazione con *B. divergens*, sia a livello molecolare, con solamente 31 bp di differenza (Lempereur e coll., 2010), ma soprattutto a livello sierologico causando cross-reazioni al momento della diagnosi. Prima del suo isolamento, questa peculiarità potrebbe aver oscurato la reale prevalenza di *Babesia* EU1 a favore di *B. divergens* (Casati e coll., 2006).

Il ritrovamento dei campioni di zecche positivi è avvenuto in parchi frequentati dall'uomo, in particolare in sentieri naturalistici, aree pic-nic e zone giochi per bambini. I risultati ottenuti stanno ad indicare la presenza del rischio di contatto con zecche infette e la conseguente possibilità di trasmissione all'uomo dell'infezione da *Babesia* EU1.

***Anaplasma phagocytophilum*:** In Italia la presenza di questo patogeno è stata investigata principalmente nelle regioni centro-meridionali in diverse specie animali tra cui cavalli (16,89%), bovini (16,78%), pecore (12,74%), capre (4,16%), daini (42,26%), cervi (46,15%), volpi, e topi (Torina e coll., 2008; 2010; Ebani e coll., 2008; 2011; Passamonti e coll., 2010) e su cani con prevalenza del 3,76% (Otranto e Dantas Torres, 2010) e del 8,76% (Ebani e coll., 2008). Un recente studio condotto in Sicilia su cavalli e asini ha evidenziato prevalenze del 9,0 e del 6,0 % rispettivamente (Giudice e coll., 2012). Altri autori riportano dati di prevalenza dell'infezione in daini del Bosco della Mesola (27,77%) (Veronesi e coll., 2011) e di caprioli nel Nord-Est del paese (5,11%) (Carpi e coll., 2009). Questi studi hanno anche preso in considerazione le zecche presenti sugli animali al momento del campionamento, ma solo Torina e coll. (2010) hanno analizzato anche zecche prelevate a livello ambientale in Sicilia.

Nel corso della nostra indagine, tra le "feeding ticks" sono stati ottenuti 10 campioni positivi (14,7%): 6 esemplari di *I. ricinus*, 1 di *R. turanicus*, 1 di *R. sanguineus*, 1 di *I. acuminatus* e 1 di *R. bursa*. Per quanto riguarda *I. ricinus*, un esemplare femmina è stata ritrovata su una persona, altri due esemplari femmine su un gatto e le altre zecche appartenenti a questa specie sono state rinvenute su cani. Gli altri esemplari sono stati tutti raccolti su cani.

Ad ora, in Italia, non sono stati rinvenuti altri studi sulla prevalenza di infezione da *A. phagocytophilum* nelle zecche prelevate a livello ambientale.



In Europa invece sono disponibili analisi sulle zecche ambientali e si segnalano prevalenze che variano in generale da 1,4 a 17, 5% (Rosef e coll., 2009; Liz e coll., 2000; Sen e coll., 2011), con l'eccezione della Bulgaria in cui è segnalato un tasso di infezione del 33,9% (Christova e coll., 2001).

In questo studio la prevalenza a livello ambientale è risultata essere del 9,6%, in linea con le prevalenze riscontrate a livello europeo. I campioni di origine ambientale risultati positivi sono stati rinvenuti in tutti i siti di campionamento, tranne che al Parco del Carnè. Nello specifico a Cà de Mandorli è stata riscontrata una prevalenza del 10,4%, a Ciagnano del 6,6%, a Monteveglio del 14,9%.

L'analisi filogenetica del gene 23S-5S rRNA ha permesso di identificare 6 varianti negli isolati da noi ottenuti. Il confronto con i pochi ceppi disponibili su GenBank, relativi a questo gene, ottenuti da mammiferi provenienti dagli Stati Uniti evidenzia come le nostre sequenze si differenzino solo per poche mutazioni puntiformi. Nell'analisi filogenetica sono stati inclusi anche isolati ottenuti da lucertole, sempre di origine nord americana, che però si presentano nettamente differenti rispetto ai ceppi ottenuti dai mammiferi.

La successiva analisi filogenetica condotta sul gene *msp4* ha permesso di evidenziare come gli isolati ottenuti si localizzino all'interno di cluster a cui fanno capo altri ceppi isolati da ruminanti, capriolo e capra, suggerendo che anche gli isolati del presente studio possano avere un'origine simile, considerando che la presenza di caprioli è stata ampiamente documentata nelle aree campionate. La presenza di *A. phagocytophilum* è stata descritta in caprioli e in cervi in varie parti d'Europa (Stuen e coll., 2001; Petrovec e coll., 2002).

Tra le sequenze utilizzate per questa analisi, due sono state ottenute da zecche campionate in fase di alimentazione su un cane e su un gatto. Nel nostro studio non è stato possibile investigare l'eventuale presenza del patogeno anche negli animali da cui erano state prelevate le zecche, inoltre in GenBank non sono disponibili isolati da queste specie animali. Il marker genetico da noi utilizzato non ci permette quindi di determinare l'origine degli isolati, ovvero se il patogeno fosse presente all'interno della zecca prima del pasto di sangue o se invece l'abbia assunto alimentandosi sul cane e sul gatto.

In uno studio condotto in Italia, utilizzando altri marker genici (16S rRNA) era stato evidenziato che alcuni isolati provenienti dalla Sardegna erano geneticamente correlati a isolati americani di comprovata azione patogena (Alberti e coll., 2005). Inoltre bisogna considerare che i ceppi umani di HGA in USA e Europa sono differenti dai ceppi che causano l'infezione nei ruminanti, quindi, bisognerebbe definire se gli isolati da noi ottenuti possano essere patogeni per l'uomo o no, eventualmente implementando le analisi utilizzando altri marker o ampliando i campionamenti anche ai mammiferi che frequentano i parchi oggetto di studio.

***Borrelia burgdorferi* s.l.:** l'agente eziologico della malattia di Lyme è stato ampiamente studiato nell'uomo.

Per quanto riguarda la diffusione in Europa alcuni lavori riportano dati di prevalenza in zecche ambientali dell'11,3% in Lussemburgo (Reye e coll., 2010), del 22,1% in Serbia (Savic e coll., 2010), uno studio condotto nella zona di Belgrado riporta una prevalenza del 21,9% (Cekanac e coll., 2010), in

Repubblica Ceca è segnalata una percentuale di positività del 35% (Danielová e coll., 2004) e del 14,8% nella zona di Brno (Pejchalová e coll., 2007), in Austria del 14% (Stanek, 2009), in Germania del 20,2% (Crowder e coll., 2010) e del 3,1% (Franke e coll., 2011), in Svizzera del 20% (Jouda e coll., 2004) e del 17,4% (Gern e coll., 2010), in Portogallo del 14,2% (Baptista e coll., 2004), del 5,4% in Polonia (Cisak e coll., 2006), del 13,2% in Francia (Quessada e coll., 2003).

In questa ricerca è stata ottenuta una prevalenza del 21,6% sul totale dei campioni analizzati mentre, limitatamente alle zecche prelevate dall'ambiente, la percentuale è stata del 26,7%. Nel dettaglio la prevalenza a Cà de Mandorli è del 37,5%, a Ciagnano del 22,1%, a Monteveglio del 25,4% e a Carnè del 29,1%. Non è stata riscontrata positività tra le "feeding ticks".

Le successive analisi, condotte su 58 campioni, hanno permesso la genotipizzazione delle specie mediante PCR-RFLP del frammento 23S-5S rRNA, in base al pattern ottenuto attraverso gli enzimi di restrizione MseI e DraI, e grazie al sequenziamento dei geni 23S-5S rRNA e FlaB. In totale sono state identificate 5 genospecie con 12 diversi patterns di restrizione: *B. afzelii* (7 campioni), *B. burgdorferi* s.s. (11 campioni), *B. garinii* (29 campioni), *B. lusitaniae* (6 campioni) e *B. valaisiana* (3 campioni). *B. garinii* è risultata la genospecie più frequente (50%) tra i campioni positivi. Le sequenze ottenute, anche all'interno della stessa genospecie, hanno blastato con isolati differenti.

Altri lavori riportano le stesse genospecie da noi riscontrate, con prevalenza maggiore di *B. garinii* rispetto alle altre genospecie (Jouda e coll., 2004; Pejchalová e coll., 2007).

In Italia la presenza nelle zecche è stata investigata nel Nord-Est, dove è stata riscontrata una prevalenza maggiore del 20% (Nazzi e coll., 2010), in Lombardia è stata evidenziata una prevalenza del 18% (Pistone e coll., 2010), in Toscana uno studio ha rilevato la presenza di *B. burgdorferi* s.l. nel 16,7% delle ninfe e nel 39,6% degli adulti campionati.

Viceversa in questo studio la percentuale di positività tra le ninfe è risultata essere del 30%, mentre è minore tra gli adulti (13,55%).

**Coinfezioni:** 16 campioni hanno presentato infezioni concomitanti, nello specifico 6 presentavano la doppia infezione *A. phagocytophilum*/*B. burgdorferi* s.l., 4 *B. burgdorferi* s.l./*Theileria* spp., 3 campioni *B. burgdorferi* s.l./*Babesia* EU1, 2 campioni *A. phagocytophilum*/*Babesia* EU1 e un campione presentava *B. burgdorferi* s.l./*B. divergens*.

Altri autori hanno segnalato la presenza di coinfezioni in *I. ricinus*: in particolare l'associazione *Borrelia* spp./*Babesia* spp. nel 5,9% delle zecche campionate in Germania (Hildebrandt e coll., 2010), la stessa associazione è stata riscontrata anche da Franke e coll. (2010) sempre in Germania, che hanno individuato anche l'associazione *A. phagocytophilum*/*Babesia* spp. Coinfezioni tra *A. phagocytophilum* e *B. afzelii* sono state segnalate anche in Russia (Masuzawa e coll., 2008).

Altri autori segnalano la presenza di *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* s.l. e *B. microti* contemporaneamente (Wójcik-Fatla e coll., 2009).

Nel presente studio, viceversa, non è mai stata riscontrata la presenza di coinfezioni con più di due agenti infettanti coinvolti.

### 7.3 CONCLUSIONI

Le malattie infettive e parassitarie trasmesse da zecche presenti in tutto il mondo, sono segnalate soprattutto nelle aree tropicali e sub-tropicali, ma sono rinvenute anche in varie zone temperate; Babesiosi e Theileriosi sono le principali parassitosi trasmesse da zecche riscontrate in Europa (L'Hostis e Seegers, 2002). Per quanto riguarda le batteriosi, la malattia di Lyme è la più frequente patologia trasmessa da zecche nell'emisfero settentrionale, mentre l'anaplasmosi granulocitica, oltre ad essere la più frequente malattia da zecche degli animali in Europa (Stuen, 2007), è la terza infezione in ordine di frequenza, nell'uomo in USA e in Europa (Dumler, 2012).

Svariati fattori possono contribuire all'emergenza o ri-emergenza di patologie trasmesse da zecche, tra cui: la farmaco-resistenza, l'evoluzione genetica del vettore o del patogeno ed i cambiamenti ambientali. In questi sono incluse le continue e progressive variazioni climatiche (L'Hostis e Seegers, 2002), ma anche ad esempio, un aumento dei terreni utilizzati per l'allevamento estensivo, in seguito al crescente interesse verso i prodotti biologici (Thompson, 2001). Per quanto riguarda il primo aspetto, una delle modificazioni climatiche più importanti degli ultimi anni è l'aumento della temperatura, che ha permesso un maggior sviluppo dei parassiti anche in zone in cui la loro densità, a causa di temperature più basse, era in precedenza minore (Coles, 2001). Dal punto di vista invece dell'utilizzo dei terreni, l'ampliamento delle aree per l'allevamento ha determinato una maggior probabilità di incontro sia fra gli animali domestici ed i luoghi in cui sono presenti le zecche, sia fra animali domestici e selvatici con un conseguente maggior rischio di trasmissione di patogeni (Thompson, 2001).

A questi fattori si aggiungono anche un aumento del numero di persone immunocompromesse, e di conseguenza più sensibili, ed una maggior attenzione alle patologie trasmesse da zecche in corso di diagnosi differenziale (Kjemtrup e Conrad, 2000).

Grande importanza riveste anche il crescente interesse per le attività all'aperto, che spinge l'uomo ad un più stretto contatto con luoghi in cui le zecche normalmente compiono il loro ciclo vitale.

I cambiamenti climatici possono favorire lo sviluppo e la diffusione dei vettori (Gould e Higgs, 2009), aumentando di conseguenza la distribuzione delle malattie da loro trasmesse anche in aree in cui non erano presenti (Takken e Knols, 2007).

Risulta quindi necessario ampliare e approfondire gli studi per poter rilevare e caratterizzare la diffusione di queste patologie.

Con questa ricerca si è investigato sulla diffusione delle zecche in alcuni parchi pubblici dell'Emilia Romagna, ad ora mai indagati, cercando di apportare un contributo alla conoscenza sulla diffusione di patogeni, potenziali agenti di zoonosi.

Per quanto riguarda le zecche si è fornito un contributo alla conoscenza della distribuzione delle zecche ixodidae anche in Italia, evidenziando in particolare la presenza di *Scaphixodes frontalis* che non era mai stata segnalata prima in Emilia Romagna.

Per quanto riguarda i patogeni trasmessi, i risultati da noi ottenuti evidenziano una notevole circolazione di *Borrelia burgdorferi* s.l., la presenza di specie di

*Babesia* possibili agenti di zoonosi, quali *Babesia* EU1 e *B. divergens*, e la presenza di *A. phagocytophilum* all'interno delle zecche campionate.

La frequentazione di queste aree può quindi essere un fattore di rischio per l'uomo di contrarre infezioni, più o meno gravi, in relazione anche allo stato di salute. Ad esempio la borreliosi di Lyme negli ultimi anni è stata segnalata anche in Emilia Romagna. Presso l'Unità Operativa di Malattie Infettive dell'Ospedale S. Orsola di Bologna da giugno 2010 sono stati registrati 10 casi, di cui due riferiti a bambini (comunicazione personale).

Fra le indicazioni emerse da questo studio si segnala come nel mese di maggio si sia riscontrato il picco della presenza delle ninfe. Poiché *B. burgdorferi* si trova con più frequenza nella forma ninfale, questa stagione potrebbe essere considerata come la più a rischio per la trasmissione del patogeno. La divulgazione di questo dato potrebbe fornire indicazioni riguardo alle precauzioni da osservare nei periodi di maggior rischio.

Come già detto le località dove sono stati svolti i campionamenti sono in vastissima parte parchi pubblici attraversati da sentieri naturalistici, dotati di aree pic-nic e di svago, frequentate spesso anche da famiglie e bambini. L'importanza di questa tesi sta nel fatto di aver ampliato le conoscenze sulla presenza di zecche e dei patogeni da esse veicolati; tali dati possono essere utilizzati per effettuare campagne di informazione presso le popolazioni, consigliando i periodi e gli atteggiamenti più idonei e le misure di profilassi da adottare durante la frequentazione di aree considerate a rischio.

Per meglio delineare il reale rischio zoonosico potrebbe essere interessante ampliare le zone di campionamento, estendendole anche ad altri parchi pubblici, ricercare i patogeni anche nei mammiferi reservoir di infezione e approfondire gli studi filogenetici per meglio descrivere i ceppi circolanti.

# 8

# BIBLIOGRAFIA

- AA. VV., (2010): Scientific Opinion on Geographic Distribution of Tick-borne Infections and their Vectors in Europe and the other Regions of the Mediterranean Basin. **EFSA Journal** **2010**; 8 (9)
- AA.VV., (2007): Opinion of the Scientific Panel on AHAW on a request from the European Commission on the risk of tick introduction into the UK, Ireland, and Malta as a consequence of abandoning the national rule, **The EFSA Journal** **2007**, 469: 1-102.
- Aberer E., Neumann R., Stanek G. (1985): Is localised scleroderma a *Borrelia* infection? **Lancet**, 2: 278.
- Ackermann R., Kabatzki J., Boisten H. P., Steere A. C., Grodzicki R. L., Hartung S., Runne U. (1984): Spirochete etiology of erythema chronicum migrans disease. **Dtsch. Med. Wochenschr.** 109: 92–97.
- Adelus F. (1995): Le malattie del cane trasmesse da zecche. **Professione veterinaria**, 6 (suppl. 2): 1-24.
- Afzelius A. (1921): Erythema chronicum migrans. **Acta Derm. Venereol.**, 2: 120-125. Citato da Bhate C., Schwartz R. A., 2011.
- Agüero-Rosenfeld M. E. (2002): Diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis: state of the art. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, 2(4): 233-239.
- Agüero-Rosenfeld M. E., Donnarumma L., Zentmaier L., Jacob J., Frey M., Noto R., Carbonaro C. A., Wormser G. P. (2002): Seroprevalence of antibodies that react with *Anaplasma phagocytophila*, the agent of human granulocytic ehrlichiosis, in different populations in Westchester County, New York. **J. Clin. Microbiol.**, 40: 2612-2615.
- Agüero-Rosenfeld M. E., Horowitz H. W., Wormser G. P., McKenna D. F., Nowakowski J., Muñoz J., Dumler J. S. (1996): Human granulocytic ehrlichiosis: a case series from a medical center in New York State. **Ann Intern Med.**, 125: 904–908.
- Agüero-Rosenfeld M. E., Kalantarpour F., Baluch M., Horowitz H. W., McKenna D. F., Raffalli J. T., Hsieh T. C., Wu J., Dumler J. S e Wormser G. P. (2000): Serology of culture-confirmed cases of human granulocytic ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, 38: 635-638.
- Agüero-Rosenfeld M. E., Wang G., Schwartz I., Wormser G. P. (2005): Diagnosis of lyme borreliosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, 18: 484-509.
- Aguirre D. H., Viñabal A. E., Salatin A. O., Cafrune M. M., Volpogni M. M., Mangold A. J., Guglielmone A. A. (2000). Susceptibility to two pyrethroids in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) populations in northwest Argentina: preliminary results. **Vet. Par.**, 88: 329–334.
- Akkoyunlu M., Fikrig E. (2000): Gamma interferon dominates the murine cytokine response to the agent of human granulocytic ehrlichiosis and helps to control the degree of early rickettsemia. **Infect Immun.**, 68: 1827–1833.
- Akkoyunlu M., Malawista S. E., Anguita J., Fikrig E. (2001): Exploitation of interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis by the agent of human granulocytic ehrlichiosis. **Infect Immun.**, 69: 5577–5588.
- Alban P. S., Johnson P. W., Nelson D. R. (2000): Serum-starvation-induced changes in protein synthesis and morphology of *Borrelia burgdorferi*. **Microbiology**, 146: 119-127.
- Alberdi M. P., Walker A. R., Paxton E. A., Sumption K. J. (1998): Natural prevalence of infection with *Ehrlichia* (Cytoecetes) *phagocytophila* of *Ixodes ricinus* ticks in Scotland. **Vet Parasitol.**, 78(3): 203-213.
- Alberti A, Zobba R, Chessa B, Addis MF, Sparagano O, Pinna Parpaglia ML, Cubeddu T, Pintori G, Pittau M. (2005): Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. **Appl. Environ. Microbiol.** 71(10): 6418-6422.
- Alekseev A. N., Dubinina H. V., van de Pol I., Schouls L. M. (2001): Identification of *Ehrlichia* e *Borrelia burgdorferi* species in *Ixodes* ticks in the Baltic region of Russia. **J. Clin. Microbiol.**, 39: 2237-2242.
- Allsopp M.T.E.P., Cavalier-Smith T., De Waal D.T., Allsopp B.A. (1994): Phylogeny and evolution of the piroplasms. **Parasitology**, 108: 147-152.

## Bibliografia

- Alonso-Díaz M. A., García L., Galindo-Velasco E., Lezama-Gutierrez C. A., Angel-Sahagún C. A., Rodríguez-Vivas R. I., Fragoso-Sánchez H. (2007): Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. **Vet. Par.**, 147: 336–340.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Meyers E. W., Lipman D. J. (1990): Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, 215: 403-410.
- Amusategui I., Tesouro M. A., Kakoma I., Sainz A. (2008): Serological reactivity to *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in dogs from northwestern Spain. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, 8: 797–803.
- Anderson J. F. (1991): Epizootiology of Lyme borreliosis. **Scand. J. Infect. Dis.**, 77: 23–34.
- Anderson J. F., Johnson R. C., Magnarelli L. A., Hyde F. W., Myers J. E. (1986): *Peromyscus leucopus* and *Microtus pennsylvanicus* simultaneously infected with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti*. **J. Clin. Microbiol.**, 23: 135–137.
- Anderson J. F., Magnarelli L. A., Donner C. S., Spielman A e Piesman J. (1979): Canine *Babesia* new to North America. **Science**, 204: 1431-1432.
- Anderson J. F., Magnarelli L. A., LeFebvre R. B., Andreadis T. G., McAninch J. B., Perng G. C., Johnson R. C. (1989): Antigenically variable *Borrelia burgdorferi* isolated from cottontail rabbits and *Ixodes dentatus* in rural and urban areas. **J. Clin. Microbiol.**, 27: 13-20.
- Anderson J. F., Magnarelli L.A. (2008): Biology of Ticks. **Infect Dis Clin North Am**, 22: 195-215.
- Anderson, B. E., Dawson, J. E., Jones, D. C. & Wilson, K. H. (1991): *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, 29: 2838-2842.
- Andrews N. W., Webster P. (1991): Phagolysosomal escape by intracellular pathogens. **Parasitology Today**, 7: 335-340.
- Angus B. M. (1996). The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. **Int. J. Parasitol.**, 26: 1341–1355.
- Aoki K., Kamata H., Iida T., Suzuki H. (1984): Tick bite: two cases studied by scanning electron microscopy. **Brit. J. Derm.**, 110: 233-240.
- Appel M. J., Allan S., Jacobson R. H., Lauderdale T. L., Chang Y. F., Shin S. J., Thomford J. W., Todhunter RJ, Summers B. A. (1993): Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. **J Infect Dis.**, 167: 651-664.
- Armstrong P. M., Katavolos P., Caporale D. A., Smith R. P., Spielman A., Telford S. R. III. (1998): Diversity of *Babesia* infecting deer ticks (*Ixodes dammini*). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 58: 739–742.
- Arnez M, Petrovec M, Lotric-Furlan S, Zupanc TA, Strle F. (2001): First European pediatric case of human granulocytic ehrlichiosis. **J Clin Microbiol**; 39: 4591–4592.
- Asbrink E. (1985): Erythema chronicum migrans Afzelius and acrodermatitis chronica atrophicans. Early and late manifestations of Ixodes ricinusborne Borrelia spirochetes. **Acta. Derm. Venereol. Suppl. (Stockh)**, 118: 1-63.
- Asbrink E., Hovmark A. (1985): Successful cultivation of spirochetes from skin lesions of patients with erythema chronicum migrans Afzelius and acrodermatitis chronica atrophicans. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. B**, 93: 161–163.
- Avanzi S., Messa G., Marbini A., Pavesi G., Granella F. (1998): Isolated neuritis of the sciatic nerve in a case of Lyme disease. **Ital. J. Neurol. Sci.**, 19(2): 81-85.
- Babes V. (1888): Sur l'hémoglobinurie bacteri enne du boeuf. **C.R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie**, 107: 692-694
- Bacon R. M., Kugeler K. J., Mead P. S. (2008): Surveillance for Lyme disease—United States, 1992-2006. **MMWR Surveill. Summ.**, 57: 1-9.
- Bakken J. S, Krueth J., Tilden R.L., Dumler J. S., Kristiansen B .E. (1996a): Serological evidence of human granulocytic ehrlichiosis in Norway. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, 15: 829–832.
- Bakken J. S. e Dumler J. S. (2004): Ehrlichiosis and anaplasmosis. **Infect. Med.**, 21: 433-451.
- Bakken J. S., Aguero-Rosenfeld M. E., Tilden R. L., Wormser G. P., Horowitz H. W., Raffalli J.

- T., Baluch M., Riddell D., Walls J. J., Dumler J. S. (2001): Serial measurements of hematologic counts during the active phase of human granulocytic ehrlichiosis. **Clin. Infect. Dis.**, 32(6): 862-870.
- Bakken J. S., Dumler J. S. (2006): Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1078: 236-247.
  - Bakken J. S., Dumler S. (2008): Human granulocytic anaplasmosis. **Infect Dis Clin North Am.**, 22: 443-448.
  - Bakken J. S., Erlemeyer S. A., Kanoff R. J., Silvestrini T. C., Goodwin D. D., Dumler J. S. (1998a): Demyelinating polyneuropathy associated with human granulocytic ehrlichiosis. **Clin Infect Dis.**, 27: 1323-1324.
  - Bakken J. S., Goellner P., Van Etten M., Boyle D. Z., Swonger O. L., Mattson S., Krueth J., Tilden R. L., Asanovich K., Walls J., Dumler J. S. (1998b): Seroprevalence of human granulocytic ehrlichiosis among permanent resident of northwestern Wisconsin. **Clin. Infect. Dis.**, 27: 1491-1496.
  - Bakken J. S., Krueth J., Lund T., Malkovitch D., Asanovich K., Dumler J. S. (1996a): Exposure to deer blood may be a cause of human granulocytic ehrlichiosis. **Clin Infect Dis.**, 23: 198.
  - Bakken J. S., Krueth J., Wilson-Nordskog C., Tilden R. L., Asanovich K., Dumler J. S. (1996b): Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. **JAMA**, 275: 199-205.
  - Bakken J. S., Tilden R. L., Walls J., Dumler J. S. (1999): Influence of occupation, pre-existing illness, and chronic medication use on the severity of illness of human granulocytic ehrlichiosis (HGE). In: Raoult D., Brouqui P. (Eds.), **Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millenium**. Elsevier, Paris, pp 195-198.
  - Bakken J.S., Dumler J. S., Chen S. M., Eckman M. R., van Etta L. L., Walker D. H. (1994): Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? **JAMA**, 272: 212-218.
  - Bakken J.S., Dumler J.S. (2000): Human granulocytic ehrlichiosis. **Clin. Infect. Dis.**, 31(2): 554-560.
  - Bakken L. L., Case K. L., Callister S. M., Bourdeau N. J., Schell R. F. (1992): Performance of 45 laboratories participating in a proficiency testing program for Lyme disease serology. **JAMA**, 268: 891-895.
  - Balashov Y. S. (1956): Nutrizione e spermatogenesi nei maschi delle zecche Ixodidae (in russo). **Dokl. Akad. Nauk.**, 110: 1133-1136.
  - Balashov Y. S. (1972): Bloodsucking ticks (Ixodidea). Vector of diseases of man and animals. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, 8: 161-376.
  - Baldwin C. L., Black S. J., Brown W. C., Conrad P. A., Goddeeris B. M., Kinuthia S. W., Lalor P. A., MacHugh N. D., Morrison W. I., Morzaria S. P., et al. (1988): Bovine T cells, B cells, and null cells are transformed by the protozoan parasite *Theileria parva*. **Infect. Immun.**, 56: 462-467.
  - Banerjee R, Anguita J, Roos D, Fikrig E. (2000): Cutting edge: infection by the agent of human granulocytic ehrlichiosis prevents the respiratory burst by down-regulating gp91phox1. **J Immunol.**, 164: 3946-3949.
  - Baptista S., Quaresma A., Aires T., Kurtenbach K., Santos-Reis M., Nicholson M., Collares-Pereira M. (2004): Lyme borreliosis spirochetes in questing ticks from mainland Portugal. **Int. J. Med. Microbiol.**, 293 Suppl 37: 109-116.
  - Barandika J.F, Hurtado A., Juste R.A., Garcia-Pérez A.L. (2010): Seasonal Dynamics of *Ixodes ricinus* in a 3-Year Period in Northern Spain: First Survey on the Presence of Tick-Borne Encephalitis Virus. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 10 (10): 1027-1035.
  - Baranton G., De Martino S. J. (2009): *Borrelia burgdorferi* sensu lato diversity and its influence on pathogenicity in humans. **Curr. Probl. Dermatol.**, 37: 1-17.
  - Baranton G., Postic D., Saint Girons I., Boerlin P., Piffaretti J C., Assous M., Grimont P. A. (1992): Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 42: 378-383.



## Bibliografia

- Barbet A. F., Lundgren A., Yi J., Rurangirwa F. R., Palmer G. H. (2000): Antigenic variation of *Anaplasma marginale* by expression of MSP2 mosaics. **Infect Immun.**, 68: 6133–6138.
- Barbour A. G. (1984): Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. **Yale J. Biol. Med.**, 57: 521–525.
- Barbour A. G. (1988): Laboratory aspects of Lyme borreliosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, 1: 399–414.
- Barbour A. G., Bunikis J., Travinsky B., Hoen A. G., Diuk-Wasser M. A., Fish D., Tsao J. I. (2009): Niche partitioning of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia miyamotoi* in the same tick vector and mammalian reservoir species. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 81(6): 1120-1131.
- Barbour A. G., Hayes S. F. (1986): Biology of *Borrelia* species. **Microbiol. Rev.**, 50: 381–400.
- Barbour A. G., Maupin G. O., Teltow G. J., Carter C. J., Piesman J. (1996): . Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: Possible agent of a Lyme diseaselike illness. **J. Infect. Dis.** 173: 403–409.
- Barlough J., Madigan J., DeRock E. e Bigornia L. (1996): Nested polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia equi* genomic DNA in horses and ticks (*Ixodes pacificus*). **Vet. Parasitol.**, 63: 319-329.
- Barlough J., Madigan J., Kramern V., Clover J., Hui L., Webb J. e Vredevoe L. (1997): *Ehrlichia phagocytophila* genogroup rickettsiae in ixodid ticks from California collected in 1995 and 1996. **J. Clin. Microbiol.**, 3: 2018-2021.
- Barnett S. F. (1965): The chemotherapy of *Babesia bigemina* infection in cattle. **Vet. Sci. Res.**, 6: 397-415.
- Barré N., Garris G. I., Lorvelec O. (1997): Field sampling of the tick *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) on pastures in Guadeloupe; attraction of CO<sub>2</sub> and/or tick pheromones and conditions of use. **Exp Appl Acarol**, 21: 95-108.
- Bartunek P., Gorican K., Mrazek V., Varejka P., Veiser T., Hercogova J., Hulínská D., Janovská D. (2006): Lyme borreliosis infection as a cause of dilated cardiomyopathy. **Prague Med. Rep.**, 107: 213-226.
- Bauerfeind R., Kreis U., Weiß R. Wieler L. H., Baljer G. (1998): Detection of *Borrelia burgdorferi* in urine specimens dogs by a nested polymerase chain reaction. **Zentralbl. Bakteriol.**, 287: 347-361.
- Bayard-McNeeley M., Bansal A., Chowdhury I., Girao G., Small C. B., Seiter K., Nelson J., Liveris D., Schwartz I., Mc Neeley D. F., Wormser G. P., Aguero-Rosenfeld M. E.(2004): In vivo and in vitro studies on *Anaplasma phagocytophilum* infection of the myeloid cells of a patient with chronic myelogenous leukaemia and human granulocytic ehrlichiosis. **J. Clin. Pathol.** 57: 499–503.
- Beall M. J., Chandrashekar R., Eberts M. D., Cyr K. E., Diniz P. P., Mainville C., Hegarty B. C., Crawford J. M., Breitschwerdt E. B. (2008): Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* species in dogs from Minnesota. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, 8: 455–464.
- Beattie J. F., Michelson M. L., Holman P.J. (2002): Acute babesiosis caused by *Babesia divergens* in a resident of Kentucky. **N. Engl. J. Med.**, 347: 697-698.
- Behl R., Klein M. B., Dandele L., Bach R. R., Goodman J. L., Key N. S. (2000): Induction of tissue factor procoagulant activity in myelomonocytic cells inoculated by the agent of human granulocytic ehrlichiosis. **Thromb Haemost.**, 83: 114–118.
- Benach J. L., Bosler E. M., Hanrahan J. P., Coleman J. L., Habicht G. S., Bast T. F., Cameron D. J., Ziegler J. L., Barbour A. G., Burgdorfer W., Edelman R., Kaslow R. A. (1983): Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. **N. Engl. J. Med.** 308: 740–742. Citato da Shapiro e Gerber, 2000.
- Benach J. L., Coleman J. L., Habicht G. S., MacDonald A., Grunwaldt E., Giron J. A. (1985): Serological evidence for simultaneous occurrences of Lyme disease and babesiosis. **J. Infect. Dis.**, 152: 473-477.
- Benach J. L., Habicht G. S. (1981): Clinical characteristics of human babesiosis. **J. Infect. Dis.**, 144: 481.

## Bibliografia

- Benach J. L., White D. J., McGovern J. P. (1978): Babesiosis in Long Island: host-parasite relationships of rodent-and human-derived *Babesia microti* isolates in hamsters. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 27: 1073–1078.
- Benjamin M. A., Zhioua E., Ostfeld R.S. (2002): Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, 39: 723–728.
- Bergstrom S., Barbour A. G., Garon C. F., Hindersson P., Saint Girons I., Girons I., Schwan T. G.. (1991): Genetics of *Borrelia burgdorferi*. **Scand. J. Infect. Dis. Suppl.**, 77: 102–107.
- Bernard W. V., Cohen D., Bosler E., Zamos D. (1990): Serologic survey for *Borrelia burgdorferi* antibody in horses referred to a mid-Atlantic veterinary teaching hospital. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 196: 1255–1258.
- Bertolotti L., Tomassone L., Tramuta C., Grego E., Amore G., Ambrogi C., Nebbia P., Mannelli A. (2006): *Borrelia lusitaniae* and spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Tuscany, central Italy. **J. Med. Entomol.**, 43: 159-165.
- Beveridge E. (1969): Babesicidal effect of basically substituted of carbanilides II. Imidocarb in rats and mice: toxicity and activity against *Babesia rodhaini*. **Res. Vet. Sci.**, 10: 534-539.
- Bhate C., Schwartz R. A. (2011a): Lyme disease Part I. Advances and perspectives. **J. Am. Acad. Dermatol.**, 4: 619-636.
- Bhate C., Schwartz R. A. (2011b): Lyme disease. Part II. Management and prevention. **J. Am. Acad. Dermatol.**, 64 (4): 639-653.
- Bhide M, Yilmaz Z, Golcu E, Torun S, Mikula I. (2008): Seroprevalence of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs and horses in Turkey. **Ann. Agric. Environ. Med.**, 15(1): 85-90.
- Binnicker M. J., Jespersen D. J., Harring J. A., Rollins L. O., Bryant S. C., Beito E. M. (2008): Evaluation of two commercial systems for automated processing, reading, and interpretation of Lyme borreliosis Western blots. **J. Clin. Microbiol.**, 46: 2216-2221.
- Birkenheuer A. J., Correa M. T., Levy M. G., Breitschwerdt E. B. (2005): Geographic distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dog bites: 150 cases (2000-2003). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 227: 942-947.
- Birkenheuer A. J., Neel J., Ruslander D., Levy M. G., Breitschwerdt E. B. (2004): Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. **Vet. Parasitol.**, 124: 151-160.
- Birkner K., Steiner B., Rinkler C., Kern Y., Aichele P., Bogdan C., von Loewenich F. D. (2008): The elimination of *Anaplasma phagocytophilum* requires CD41 T cells, but is independent of Th1 cytokines and a wide spectrum of effector mechanisms. **Eur J Immunol.**, 38: 3395–3410.
- Birtles R. J., Harrison T. G., Saunders N. A. & Molyneux D. H. (1995): Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. **Int J Syst Bacteriol.**, 45, 1-8.
- Bishop R. P., Sohanpal B. K., Morzaria S. P., Dolan T. T., Mwakima F. N., Young A. S. (1994): Discrimination between *Theileria parva* and *Theileria taurotragi* in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks using oligonucleotides homologous to ribosomal RNA sequences. **Parasitology Research**, 80: 259-261.
- Bishop R., Musoke A., Morzaria S., Gardner M., Nene V. (2004): *Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks. **Parasitology**, 129: 271-283.
- Bjoersdorff A., Bagert B., Massung R. F., Gusa A., Eliasson I. (2002): Isolation and characterization of two European strains of *Ehrlichia phagocytophila* of equine origin. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, 9: 341–343.
- Bjoersdorff A., Brouqui P., Eliasson I., Massung R. F., Wittesjo B., Berglund J. (1999a): Serological evidence of *Ehrlichia* infection in Swedish Lyme borreliosis patients. **Scand. J. Infect. Dis.**, 31: 51–55.

- Bjöersdorff A., Svendenius L., Owens J., Massung R. (1999b): Feline granulocytic ehrlichiosis - a report of a new clinical entity and characterisation of the infectious agent. **J Small Anim Pract.**, 40: 20-24.
- Blanco J. R., Oteo J. A. (2002): Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. **Clin. Microbiol. Infect.**, 8: 763-772.
- Blaschitz M, Narodoslavsky-Gföller M, Kanzler M, Stanek G, Walochnik J. (2008): *Babesia* species occurring in Austrian *Ixodes ricinus* ticks. **Appl Environ Microbiol.**, 74: 4841-4846.
- Bock R., Jackson L., de Vos A., Jorgensen W. (2004): Babesiosis of cattle. **Parasitology**, 129: S247-S269.
- Bohme M., Schwenecke .S, Fuchs E., Wiebecke D., Karch H. (1992): Screening of blood donors and recipients for *Borrelia burgdorferi* antibodies: no evidence of *B burgdorferi* infection transmitted by transfusion. **Infusionsther Transfusionsmed**, 19: 204-207.
- Bolz D. D., Sundsbak R. S., Ma Y., Akira S., Kirschning C. J., Zachary J. F., Weis J. H., Weis J. J. (2004): MyD88 plays a unique role in host defense but not arthritis development in Lyme disease. **J. Immunol.**, 173: 2003-2010.
- Bonnet S., Jouglin M., L'Hostis M., Chauvin A. (2007): *Babesia* sp. EU1 from Roe Deer and Transmission within *Ixodes ricinus*. **Emerging Infectious Diseases**, 13: 1208-1210.
- Bool P.H., Reinders J.S. (1964): Tick-borne fever in cattle in the Netherlands. **Tijdschr. Diergeneesk.** 89: 1519-1527. Citato da Woldehiwet Z. (2010).
- Boozer A. L., Macintire D. K. (2003): Canine babesiosis. **Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.**, 33: 885-904.
- Boreham P. F. L., Wright I. G. (1976): The release of pharmacologically active substances in parasitic infections. In: Willis G.P., West G.B. (Eds.) **Progress in Medical Chemistry. North Holland Publishing**, Amsterdam, Holland, 1976, pp 160-204.
- Borjesson D. L., Kobayashi S. D., Whitney A. R., Voyich J. M., Argue C. M., Deleo F. R. (2005): Insights into pathogen immune evasion mechanisms: *Anaplasma phagocytophilum* fails to induce an apoptosis differentiation program in human neutrophils. **J Immunol.**, 174: 6364-6372.
- Borjesson D. L., Simon S. I., Tablin F., Barthold S. W. (2001): Thrombocytopenia in a mouse model of human granulocytic ehrlichiosis. **J Infect Dis.**, 184: 1475-1479.
- Bostrom B., Wolf C., Greene C., Peterson D. S. (2008): Sequence conservation in the rRNA first internal transcribed spacer region of *Babesia gibsoni* genotype Asia isolates. **Vet. Parasitol.**, 152: 152-157.
- Botros B. A. M., Moch R. V., Barsoum L. S. (1975): Some observation on experimentally induced infection of dog with *Babesia gibsoni*. **Am. J. Vet. Res.**, 36: 293-296.
- Botteron C., Dobbelaere D. (1998): AP-1 and ATF-2 are constitutively activated via the JNK pathway in *Theileria parva*-transformed T-cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 246: 418-421.
- Bourdeau P (2008) Canine vector-borne diseases in France: information obtained from veterinary clinics in national surveys. **Proceedings of the 3rd Canine Vector-Borne Disease (CVBD) Symposium**, Germany, 16-19 April, pp. 78-84.
- Bowman A. S., Nuttal P. A. (2008): Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. In: Bowman A. S. and Nuttal P. A. (Eds.) *Ticks Biology, Disease and Control*. Cambridge University press, New York, USA, 2008, pp. xi-xii.
- Bowman D, Little S. E., Lorentzen L., Shields J., Sullivan M. P. e Carlin E. P. (2009): Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: Results of a national clinic-based serologic survey. **Vet Parasitol.**, 160: 138-148.
- Bown K. J., Bennet M., Begon M., Woldehiwet Z. e Ogden N. H. (2003): Seasonal dynamics of *Anaplasma* (formerly *Ehrlichia*) *phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system in the UK. **Emerg. Infect. Dis.**, 9: 63-70.
- Brandt F., Healy G. R., Welch. M. (1977): Human babesiosis: the isolation of *Babesia microti* in golden hamsters. **J. Parasitol.**, 63: 934-937.

- Brasseur P., Lecoublet S., Kapel N., Favennec L., Ballet J. J. (1998): In vitro evaluation of drug susceptibilities of *Babesia divergens* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 42: 818–820.
- Brecht A. B., Weinstein W. M., Cohen S. (1981): Treatment of babesiosis in asplenic patients. **J. Am. Med. Assn.**, 245: 1938-1939.
- Breitschwerdt E. B., Hegarty B. C., Hancock S. I. (1998): Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. **J Clin Microbiol.**, 36: 2645–2651.
- Brenner D. J., O'Connor S. P., Winkler H. H., Steigerwalt A. G. (1993): Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*. **Int J Syst Bacteriol.** 43: 777-786.
- Brewer B. D., Harvey T. W., Mayhew I. G. (1984): Ehrlichiosis in a Florida horse. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 185: 446–447.
- Brisson D., Baxamusa N., Schwartz I., Wormser G. P. (2011): Biodiversity of *Borrelia burgdorferi* strains in tissues of Lyme disease patients. **PLoS One.**, 6(8): e22926.
- Brisson D., Dykhuizen D. E., Ostfeld R. S. (2008): Conspicuous impacts of inconspicuous hosts on the Lyme disease epidemic. **Proc. Biol. Sci.**, 275: 227-235.
- Brocklesby D. W., Barnett S. F. (1970): Large *Babesia* species transmitted to splenectomised calves by field collection of British ticks (*Haemaphysalis punctata*). **Nature (Lond.)**, 228: 1215.
- Brocklesby D. W., Harradine D. L., Young E. R. (1976): *Babesia major* in Britain: cross-immunity trials with *Babesia divergens* in splenectomized calves. **Res. Vet. Sci.**, 21 : 300-302.
- Brocklesby D. W., Harradine D. L., Young E. R. (1976): *Babesia major* in Britain: cross-immunity trials with *Babesia divergens* in splenectomized calves. **Res. Vet. Sci.**, 21 (3): 300-302.
- Brodie T. A., Holmes P. H., Urquhart G. M. (1986): Some aspects of tick-borne fever in British sheep. **Vet. Rec.**, 118: 415–418.
- Bronsdon, M. A., Homer M. J., Magera J. M. H., Harrison C., Andrews R. G., Bielitzki J. T., Emerson C. L., Persing D. H., Fritsche T. R. (1998): Detection of enzootic babesiosis in baboons (*Papio cynocephalus*) and phylogenetic evidence supporting synonymy of the genera *Entoploypoides* and *Babesia*. **J. Clin. Microbiol.** 37: 1548–1553.
- Brorson Ø, Brorson S. H. (1997) Transformation of cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to normal, mobile spirochetes. **Infection**, 25: 240-246.
- Brossard M., Aeschlimann A. (1975): Piroplasmoses bovine en Suisse italienne. **Schweiz. Arch. Tierheilkd**, 117: 287-292.
- Brossard M., Wikel S. K. W. (2004): Tick immunobiology. **Parasitology**, 129(Suppl): S161-S176.
- Brouqui P. (1999): Ehrlichiosis in Europe. In: Raoult D., Brouqui P. (Eds.) **Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millenium**, Elsevier, Paris, pp 220–232.
- Brouqui P., Bacellar F., Baranton G., Birtles R. J., Bjoersdorff A., Blanco J. R., Caruso G., Cinco M., Fournier P. E., Francavilla E., Jensenius M., Kazar J., Laferl H., Lakos A., Lotric Furlan S., Maurin M., Oteo J. A., Parola P., Perez-Eid C., Peter O., Postic D., Raoult D., Tellez A., Tselentis Y., Wilske B.; ESCMID Study Group on Coxiella, Anaplasma, Rickettsia and Bartonella; European Network for Surveillance of Tick-Borne Diseases. (2004): Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. **Clin. Microbiol. Infect.**, 10: 1108-1132.
- Brouqui P., Dumler J. S., Lienhard R., Brossard M., Raoult D. (1995): Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. **Lancet**, 346: 782-783.
- Brown C. G. D. (1987): *Theileriidae*. In: Taylor A. E. R. and Baker J. R (Eds), *In vitro* methods for parasites cultivation. Academic Press, New York, N.Y, pp 230-253.
- Brown D. J., Campbell J. D. M., Russel G. C., Hopkins J., Glass E. J. (1995): T cell activation by *Theileria annulata*-infected macrophages correlates with cytokine production. **Clin. Exp.**

- Immunol.**, 102: 507-514.
- Brown R. N., Lane R. S. (1992): Lyme disease in California: a novel enzootic transmission cycle of *Borrelia burgdorferi*. **Science**;256: 1439-1442.
  - Brownbridge M., Glare T. (2007): Impact of entomopathogenic fungus on soil-dwelling invertebrates. In: Ekesi S., Maniania N.K. (Eds.) **Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management**. Research Signpost, Kerala, India, pp. 295–392.
  - Browning A., Carter S. D., Barnes A., May C., Bennett D. (1993): Lameness associated with *Borrelia burgdorferi* infection in the horse. **Vet. Rec.** 132: 610-611.
  - Brownstein J. S., Holford T. R., Fish D. (2005): Effect of climate change on Lyme disease risk in North America. **Ecohealth**, 2: 38-46.
  - Bruckbauer H. R., Preac-Mursic V., Fuchs R., Wilske B. (1992): Crossreactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 11: 224-232.
  - Brüning A. (1996). Equine piroplasmiasis an update on diagnosis, treatment and prevention. **Brit. Vet. J.** 152: 139–151.
  - Bryant J. E., Brown M. P., Gronwall R. R., Merritt K. A. (2000): Study of intragastric administration of doxycycline: pharmacokinetics including body fluids, endometrial and minimum inhibitory concentrations. **Equine Vet. J.**, 32(3): 233-238.
  - Buchwald A. Ein Fall von diffuser idiopathischer Haut-Atrophie. **Arch Dermatol Syphilol** 1883;10:553-6. Citato da Bhate C., Schwartz R. A., 2011.
  - Bunikis J., Barbour A. G. (2002): Laboratory testing for suspected Lyme disease. **Med. Clin. North Am.**, 86: 311–340.
  - Burgdorfer W., Anderson J. F., Gern L., Lane R. S., Piesman J., Spielman A. (1991): Relationship of *Borrelia burgdorferi* to its arthropod vectors. **Scand. J. Infect. Dis.**, 77(S): 35–40.
  - Burgdorfer W., Barbour A. G., Hayes S. F., Benach J. L., Grunwaldt E., Davis J. P. (1982): Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? **Science**, 216: 1317-1319. Citato da Shapiro e Gerber, 2000.
  - Burgdorfer W., Barbour A. G., Hayes S. F., Peter O., Aeschlimann A. (1983): Erythema chronicum migrans-a tickborne spirochete-tosis: short communication. **Acta Trop.**, 40: 79-83.
  - Burgdorfer W., Hayes S. F., Corwin D. (1989): Pathophysiology of the Lyme Disease Spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in Ixodid Ticks. **Rev. Infect. Dis.**, 11 (S 6): S1442-S1450.
  - Burgdorfer W., Lane R. S., Barbour A. G., Gresbrink R. A., Anderson J. R. (1985): The western black-legged tick, *Ixodes pacificus*: a vector of *Borrelia burgdorferi*. **Am J Trop Med Hyg.**, 34: 925-30.
  - Burger D. B., Crause J. C., Spickett A. M., Neitz A. W. H. (1991): A comparative study of proteins present in sweating-sickness inducing and no-inducing strains of *Hyalomma truncatum* ticks. **Exp. Appl. Acarology**, 13: 59-63.
  - Burgess E. C (1988): *Borrelia burgdorferi* infection in Wisconsin horses and cows, **Ann. NY Acad. Sci.**, 539: 235-243.
  - Burgess E. C. (1992): Experimentally induced infection of cats with *Borrelia burgdorferi*. **Am. J. Vet. Res.**, 53: 1507-1511.
  - Burgess E. C., Gillette D., Pickett J. P. (1986): Arthritis and panuveitis as manifestations of *Borrelia burgdorferi* infection in a Wisconsin pony. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 189: 1340-1342.
  - Burgess E. C., Mattison M. (1987): Encephalitis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 191:1456-1458.
  - Burkot T. R., Maupin G. O., Schneider B. S., Denatale C., Happ C. M., Rutherford J. S. e Zeidner N. S. (2001): Use of a sentinel host system to study the questing behavior of *Ixodes spinipalpis* and its role in the transmission of *Borrelia bissetii*, human granulocytic ehrlichiosis, and *Babesia microti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 65: 293–299.
  - Bush J. B., Isaacson M., Mohamed A. S., Potgieter F. T., de Waal D. T. (1990): Human babesiosis a preliminary report of 2 suspected cases in South Africa. **S. Afr. Med. J.**, 78: 699.
  - Cabello F. C., Godfrey H. P., Newman S. A. (2007): Hidden in plain sight: *Borrelia burgdorferi* and the extracellular matrix. **Trends. Microbiol.**, 15: 350–354.

- Cacciò S. M., Antunovic B., Moretti A., Mangili V., Marinculic A., Rafaj Barc R., Slemenda S. B., Pieniazek N. J. (2002): Molecular characterisation of *Babesia canis canis* e *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. **Vet. Parasitol.**, 106: 285-292.
- Caeiro V. (1996): Biology of ticks. **Proceeding International Forum on Fleas and Ticks Control**, Rhone-Merieux: 19-23.
- Cahill K. M., Benach J. L., Reich L. M., Bilmes E., Zins J. H., Siegel F. P., Hochweis S. (1981): Red cell exchange: treatment of babesiosis in a splenectomized patient. **Transfusion**, 21: 193-198.
- Callow L. L., Mellors L. T., McGregor W., (1979): Reduction in virulence of *Babesia bovis* due to rapid passage in splenectomized cattle. **Int. J. Parasitol.**, 9: 333-338.
- Camacho A. T., Pallas E., Gestal J. J., Guitian F. J., Olmeda A. S., Goethert H. K., Telford S. R. (2001): Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti*-like agent. **Vet. Rec.**, 149: 552-555.
- Canestri-Trotti G., Corradini L. (1986): Aggiornamento alla fauna ixodologica dell'Emilia-Romagna. **Atti 14° Congresso Nazionale della Società Italiana di Parassitologia**: 215-216.
- Canica M. M., Nato F., du Merle L., Mazie J. C., Baranton G., Postic D. (1993): Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. **Scand. J. Infect. Dis.**, 25: 441-448.
- Cao W. C., Zhan L., He J., Foley J. E., De Vlas S. J., Wu X. M., Yang H., Richardus J. H. e Habbema J. D. (2006): Natural *Anaplasma phagocytophilum* infection of ticks and rodents from a forest area of Jilin Province, China. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 75: 664-668.
- Cao W. C., Zhao Q. M., Zhang P. H., Dumler J. S., Zhang X. T., Fang L. Q e Yang H. (2000): Granulocytic Ehrlichia in *Ixodes persulcatus* tick from an area in China where Lyme disease is endemic. **J. Clin. Microbiol.**, 38: 4208-4210.
- Cao W. C., Zhao Q. M., Zhang P. H., Yang H., Wu X. M., Wen B. H., Zhang X. T., Habbema J.D. (2003): Prevalence of *Anaplasma phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes persulcatus* ticks from northeastern China. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 68: 547-550.
- Capelli G., Otranto D., Pietrobelli M. (2010): Parassiti dei bovini. In: Taylor M. A., Coop R. L., Wall R. L. (Eds) *Parassitologia e malattie parassitarie degli animali*. EMSI, Roma, Italia, pp: 61-151.
- Capelli J. L., Ghernati I., Chabanne L., Magnol J.P., Delverdier A. (1996): La babèsiose canine, maladie à complexes immuns: à propos d'un cas de vascularite à manifestations cutanées. **Pratique Medicale and Chirurgicale de Animal de Compagnie**, 31: 231-239.
- Caproni L. Jr, Umehara O., Moro E., Goncalves L. C. B. (1998). Field efficacy of doramectin and ivermectin against natural infestations of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Brazilian J. Vet. Parasitol.**, 7: 151-155.
- Carlsson S. A., Granlund H., Jansson C., Nyman D., Wahlberg P. (2003): Characteristics of erythema migrans in *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii* infections. **Scand. J. Infect. Dis.**, 35: 31-33.
- Carlyon J. A., Fikrig E. (2006): Mechanism of evasion of neutrophil killing by *Anaplasma phagocytophilum*. **Curr Opin Hematol.**, 13: 28-33.
- Carpi G., Bertolotti L., Pecchioli E., Cagnacci F., Rizzoli A. (2009): *Anaplasma phagocytophilum* groEL gene heterogeneity in *Ixodes ricinus* larvae feeding on roe deer in Northeastern Italy. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, 9(2):179-184.
- Carrade D. D., Foley J. E., Borjesson D. L. e Sykes J. E. (2009): Canine Granulocytic Anaplasmosis: a review. **J. Vet. Intern. Med.**, 23: 1129-1141.
- Carrade D., Foley J., Sullivan M., Foley C. W., Sykes J. E. (2011): Spatial distribution of seroprevalence for *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Dirofilaria immitis* in dogs in Washington, Oregon, and California. **Vet. Clin. Pathol.**, 40(3): 293-302.
- Carret C., Walas F., Carcy B., Grande N., Precigout E., Moubri K., Schetters, T.P., Gorenflot A. (1999): *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small

- subunit ribosomal RNA genes. **J. Eukaryot. Microbiol.** 46: 298–303.
- Carrington M., Allsopp B., Baylis H., Malu N. M., Shochat Y., Sohal S. (1995): Lymphoproliferation caused by *Theileria parva* and *Theileria annulata*. In **Molecular Approaches to Parasitology** (ed. Boothroyd, J.C. and Komuniecki R.), pp 43-526. New York, Wiley-Liss Inc
  - Carroll J. A., Garon C. F., Schwan T. G. (1999): Effects of environmental pH on membrane proteins in *Borrelia burgdorferi*. **Infect. Immun.**, 67:3181-3187.
  - Casati S. (2005): Etude sur la diversité génétique des tiques *Rhipicephalus sanguineus* et *Ixodes ricinus*, et des agents pathogènes *Rickettsia* sp., *Coxiella* sp., *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Babesia* sp. et le virus de l'encéphalite à tique en Suisse. Ph.D. thesis. Université de Neuchâtel, Neuchâtel, Switzerland.
  - Casati S., Sager H., Gern L., Piffaretti J. C. (2006): Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. **Ann Agric Environ Med.**, 13(1): 65-70.
  - Casjens S., Palmer N., van Vugt R., Huang W. M., Stevenson B., Rosa P., Lathigra R., Sutton G., Peterson J., Dodson R. J., Haft D., Hickey E., Gwinn M., White O., Fraser C. M. (2000): A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. **Mol. Microbiol.** 35: 490-516.
  - Caspersen K., Park J. H., Patil S. e Dumler J. S. (2002): Genetic variability and stability of *Anaplasma phagocytophila* msp2 (p44). **Infect Immun.**, 70(3):1230-1234.
  - Cassini R., Bonoli C., Montarsi F., Tessarin C., Marcer F., Galuppi R. (2010): Detection of *Babesia* EU1 in *Ixodes ricinus* ticks in Northern Italy. **Vet. Parasitol.**, 171: 151-154.
  - Cassini R., Marcer F., di Regalbono A. F., Cancrini G., Gabrielli S., Moretti A., Galuppi R., Tampieri M. P., Pietrobelli M. (2012): New insights into the epidemiology of bovine piroplasmoses in Italy. **Vet Parasitol.**, 184: 77-82.
  - Caturegli P., Asanovich K. M., Walls J. J., Bakken J. S., Madigan J. E., Popov V. L., Dumler J. S. (2000): Ank A: an *Ehrlichia phagocytophila* group gene encoding a cytoplasmic protein antigen with ankyrin repeats. **Infect Immun.**, 68(9):5277–5283.
  - CDC (1995): Recommendations for test performance and interpretation from the Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, 44: 590-591.
  - CDC (2004): Lyme Disease --- United States, 2001—2002 **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, 53: 365-369. Available at <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5317a4.htm>
  - Cekanac R., Pavlovic N., Gledovic Z., Grgurevic A., Stajkovic N., Lepsanovic Z., Ristanovic E. (2010): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in Belgrade area. **Vector Borne Zoon. Dis.**, 10(5): 447-452.
  - Centeno-Lima S., do Rosario V., Parreira R., Maia A. J., Freudenthal A. M., Nijof A. M., Jogejan F. (1998): A fatal case of human babesiosis in Portugal: molecular and phylogenetic analysis. **Tropical Medicine and International Health**, 8(8): 760-764.
  - Cerri D., Farina R., Andreani R., Nuvoloni R., Pedrini A., Cardini G. (1994): Experimental infection of dogs with *Borrelia burgdorferi*. **Res. Vet. Sci.**, 57: 256-258.
  - Chang Y. F., McDonough S. P., Chang C. F., Shin K. S., Yen W., Divers T. (2000a): Human granulocytic ehrlichiosis agent infection in a pony vaccinated with a *Borrelia burgdorferi* recombinant OspA vaccine and challenged by exposure to naturally infected ticks. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, 7: 68-71.
  - Chang Y. F., Novosol V., Chang C. F., Summers B. A., Ma D. P., Chiang Y. W., Acree W. M., Chu H. J., Shin S., Lein D. H. (2001): Experimental induction of chronic borreliosis in adult dogs exposed to *Borrelia burgdorferi*-infected ticks and treated with dexamethasone. **Am. J. Vet. Res.**, 62: 1104-1112.
  - Chang Y. F., Novosol V., McDonough S. P. (2000b): Experimental infection of ponies with *Borrelia burgdorferi* by exposure to Ixodid ticks. **Vet. Pathol.**, 37(1): 68-76.
  - Chang Y., Novosol V., McDonough S. P. (1999): Vaccination against Lyme disease with

- recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A (rOspA) in horses. **Vaccine**, 18(5-6): 540-548.
- Chen, S. M., Dumler, J. S., Bakken, J. S. & Walker, D. H. (1994): Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. **J. Clin. Microbiol.**, 32: 589-595.
  - Chisholm E. S., Ruebush II T. K., Sulzer A. J., Healy G. R. (1978): *Babesia microti* infection in man: evaluation of an indirect immunofluorescent antibody test. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 27: 14-1.
  - Chochlakis D., Ioannou I., Sharif L., Kokkini S., Hristophi N., Dimitriou T., Tselentis Y., Psaroulaki A. (2009a): Prevalence of *Anaplasma* sp. in Goats and Sheep in Cyprus. **Vec.-Borne Zoon. Dis.**, 9: 457-463.
  - Chochlakis D., Psaroulaki A., Kokkini S., Kostanatis S., Arkalati E., Karagrannaki E., Tsiatis K., Tselentis Y., Gikas A. (2009b): First evidence of *Anaplasma* infection in Crete, Greece. Report of six human cases. **Clin Microbiol Infect.**, 15 Suppl 2: 8-9.
  - Chodyncka B., Flisiak I., Okrasinska K., Andrzejewska A., Schwartz R. A. (2000): Lymphocytoma cutis: cases linked with Lyme disease. **Cutis**, 66: 243-246.
  - Chodyncka B., Schwartz R. A., Flisiak I. (2009): Acrodermatitis chronic atrophicans. Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/1051695-overview>. Accessed June 20.
  - Choi K. S., Garyu J., Park J., Dumler J. S. (2003): Diminished adhesion of *Anaplasma phagocytophilum*-infected neutrophils to endothelial cells is associated with reduced expression of leukocyte surface selectin. **Infect Immun.**, 71: 4586-4594.
  - Christensson D. A., Moren T. (1987): Seroresponse (IgG) after vaccination and natural infection of cattle with *Babesia divergens*. **Acta Vet. Scand.**, 28: 393-402.
  - Christie P. J., Atmakuri K., Krishnamoorthy V., Jakubowski S., Cascales E. (2005) Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. **Annu. Rev. Microbiol.**, 59: 451-485.
  - Christova I. S., Dumler J. S. (1999): Human granulocytic ehrlichiosis in Bulgaria. **Am J Trop Med Hyg.**, 60: 58-61.
  - Christova I., Schouls L., van De Pol I., Park J., Panayotov S., Lefterova V., Kantardjiev T., Dumler J. S. (2001): High prevalence of granulocytic *Ehrlichiae* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Bulgaria. **J. Clin. Microbiol.**, 39: 4172-4174.
  - Chu C. Y., Liu W., Juany B. G., Wang D. M., Juany W. J., Zhao Q. M., Zhang P. H., Wang Z. X., Tang G. P., Yang H., Cao W. C. (2008): Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China. **J. Clin. Microbiol.**, 46: 3130-3133.
  - Chu C-Y., Jiang B-G., He J., Gao Y., Zhang P-H., Wu X-M., W-Y Zhang, Shi H., Gaowa H-S., Wang J-B., Foley J. E., Liu W., Cao W-C. (2011): Genetic Diversity of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Isolates from Northeastern China. **Vector-Borne Zoon. Dis.**, 11: 1-6.
  - Ciceroni L., Bartoloni A., Leoncini F., Ciarrocchi S., Pinto A., Favia G., Bartalesi F., Scagnoli L., Iori A. (2003): Risk of tick-borne bacterial diseases in humans in the Florence area, Tuscany. **Ann. NY Acad. Sci.**, 990: 346-349.
  - Cinco M, Padovan D, Murgia R., Poldini L., Frusteri L., van de Pol I., Verbeek-De Kruif N., Rijpkema S., Maroli M. (1998): Rate of infection of *Ixodes ricinus* ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* and group VS116 in an endemic focus of Lyme disease in Italy. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 17: 90-94.
  - Cinco M., Balanzin D., Benussi P., Trevisan G. (1993): Seroprevalence and incidence of Lyme borreliosis in forestry rangers in Friuli Venezia Giulia (northern Italy). **Alpe Achia Microbiol. J.** 2: 91-98.
  - Cinco M., Barbone F., Grazia Ciufolini M., Mascioli M., Anguero Rosenfeld M., Stefanel P., Luzzati R. (2004): Seroprevalence of tick-borne infections in forestry rangers from northeastern Italy. **Clin. Microbiol. Infect.**, 10(12): 1056-1061.
  - Cinco M., Padovan D., Murgia R., Maroli M., Frusteri L., Heldtander M., Johansson K.E., Engvall E.O. (1997): Coexistence of *Ehrlichia phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Italy as determined by 16S rRNA gene sequencing. **J. Clin.**



- Microbiol.**, 35: 3365–3366.
- Cisak E., Chmielewska-Badora J., Zwoliński J., Wojcik-Fatla A., Zajac V., Skórska C., Dutkiewicz J. (2008): Study on Lyme borreliosis focus in the Lublin region (eastern Poland). **Ann Agric Environ Med.**, 15(2): 327-332.
  - Cizman M., Avsic-Zupanc T., Petrovec M., Ruzic- Sabljic E., Pokorn M. (2000): Seroprevalence of ehrlichiosis, Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis infections in children and young adults in Slovenia. **Wien Klin Wochenschr.**, 112: 842–845.
  - Clark I. A. (1978): does endotoxin cause both the disease and parasite death in acute malaria and babesiosis? **Lancet**, 11: 75-77.
  - Clark I. A., Allison A. C. (1974): *Babesia microti* and *Plasmodium berghei* Yoeleii infection in nude mice. **Nature**, 252: 328-329.
  - Clarke C. S., Rogers E. T., Egan E. L. (1989): Babesiosis: underreporting or case-clustering? **Postgrad. Med. J.**, 65: 591–593.
  - Clyde D. F., Gilman R. H., McCarthy V. C.. (1975): Antimalarial effects of clindamycin in man. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 24: 369–370.
  - Cobbett N. G. (1947): Preliminary tests in Mexico with DDT, cube hexachlorocyclohexane (benzene hexachloride), and combinations thereof, for the control of the cattle fever tick, *Boophilus annulatus*. **Am. J. Vet. Res.**, 8: 280–283.
  - Cochez C., Ducoffre G., Vandenvelde C., Luyasu V., Heyman P. (2011): Human anaplasmosis in Belgium: a 10-year seroepidemiological study. **Ticks Tick Borne Dis.**, 2: 156-159.
  - Coetzee B. B., Stanford G. D., Davis D. A. T. (1987). The resistance spectrum shown by a fenvalerate-resistant strain of blue tick (*Boophilus decoloratus*) to a range of ixodicides. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, 54: 79–82.
  - Cole L. M., Russel A. N., Casida J. E. (1993): Action of phenylpyrazole insecticide at the GABA- gated chloride channel. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 46: 47-54.
  - Coleman J. L., Benach J. L., Beck G., Habicht G. S. (1986): Isolation of the outer envelope from *Borrelia burgdorferi*. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.**, 263: 123-126. Citato da Wang G, Schwartz I., 2011.
  - Coles G. C. (2001): The future of veterinary parasitology. **Vet. Par.**, 98: 31-39.
  - Collares-Pereira M., Couceiro S., Franca I., Kurtenbach K., Schafer S. M., Vitorino L., Goncalves L., Baptista S., Vieira M. L., Cunha C. (2004): First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. **J. Clin. Microbiol.**, 42: 1316–1318.
  - Collins J. D., Hannan J., Ferguson A. R., Wilson J. O. (1970): Tick-borne fever in Ireland. **Irish Vet. J.**, 24, 162–164.
  - Collins J.D., O Nuallain T., Ferguson A.R. (1970b): Observations of bovine babesiosis in Ireland. **Ir. Vet. J.**, 24: 42-51.
  - Colliot F. (1996): Insecticides, acaricides and nematocides used in plant protections. **Proceeding International Forum on Fleas and Ticks Control**, Rhone-Merieux: 35-44.
  - Combrink M. P., Troskie P. C., De Waal D. T. (2002): Residual effect of antibabesial drugs on the live redwater blood vaccines. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 969: 169–173.
  - Comer J. A., Nicholson W. L., Olson J. G., Childs J. E. (1999): Serologic testing for human granulocytic ehrlichiosis at a national referral center. **J Clin Microbiol.**, 37: 558–564.
  - Conrad P. A., Kjemtrup A. M., Carreno R. A., Thomford J., Wainwright K., Eberhard M., Quick R., Telford III S. R., Herwaldt B. L. (2006): Description of *Babesia duncani* n. sp. (Apicomplexa: *Babesiidae*) from humans and its differentiation from other piroplasms. **Int. J. Parasitol.**, 36: 779-789.
  - Conrad P. A., Thomford J. W., Yamane I., Whiting J., Bosma L., Uno T., Holshuh H. J., Shelly S. (1991): Hemolytic anemia caused by *Babesia gibsoni* infection in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 199: 601–605.
  - Courtney J. W., Dryden R. L., Montgomery J., Schneider BS., Smith G., Massung R. F. (2003): Molecular characterization of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes scapularis* ticks from Pennsylvania. **J. Clin. Microbiol.**, 41: 1569–1573.

- Courtney J. W., Massung R. F. (2003): Multiplex Taqman PCR assay for rapid detection of *Anaplasma phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 990: 369–370.
- Cox F. E. G. (1973): The significance of previous infections on susceptibility to infection with blood parasites. Proceeding of the 4<sup>th</sup> International Congress of Protozoology, Clearmont-Ferrand, France, 1973.
- Crippa M., Rais O., Gern L. (2002): Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. **Vector Borne Zoon. Dis.**, 2: 3–9.
- Crowder C. D., Matthews H. E., Schutzer S., Rounds M. A., Luft B. J., Nolte O., Campbell S. R., Phillipson C. A., Li F., Sampath R., Ecker D. J., Eshoo M. W. (2010): Genotypic variation and mixtures of Lyme *Borrelia* in *Ixodes* ticks from North America and Europe. **PLoS One**, 5: e10650.
- Cullen J. M., Levine J. F. (1987): Pathology of experimental *Babesia microti* infection in the Syrian hamster. **Lab. Anim. Sci.**, 37 (5): 640-643.
- Curasson G. (1943): Protozoologie veterinaire et comparée, vol.3 Sporozoaires. Vigot Frères, Paris, France.
- Curnow J. A. (1973): Studies on antigenic changes and strain differences in *Babesia argentina* infections. **Aust. Vet. J.**, 49: 279-283.
- Dalrymple B. P., Dimmock C. M., Parrodi F., Wright I. G. (1992): *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Babesia canis*, *Babesia microti* e *Babesia rodhaini*: comparison of ribosomal RNA gene organization. **Int. J. Parasitol.**, 22: 851-855.
- Dambach D. M., Smith C. A., Lewis R. M., Van Winkle T. J. (1997): Morphologic, immunohistochemical, and ultrastructural characterization of a distinctive renal lesion in dogs putatively associated with *Borrelia burgdorferi* infection:49 cases (1987-1992). **Vet. Pathol.**, 34: 85-170.
- Dandache P., Nadelman R. B. (2008): Erythema migrans. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, 22: 235-260.
- Danielová V., Daniel M., Rudenko N., Golovchenko M. (2004): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in selected South Bohemian locations (Czech Republic). **Cent. Eur J. Public. Health.**, 12(3): 151-156.
- Dantas-Torres F. (2008): The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Vet Parasitol** 152, 173-185.
- Dattwyler R. J., Luft B. J., Kunkel M. J., Finkel M. F., Wormser G. P., Rush T. J., Grunwaldt E., Agger W. A., Franklin M., Oswald D., Cockey .L, Maladorno D. (1997): Ceftriaxone compared with doxycycline for the treatment of acute disseminated Lyme disease. **N. Engl. J. Med.**, 337: 289-294.
- Davey R. B., Ahrens E. H. (1984): Control of *Boophilus* ticks on heifers with two pyrethroids applied as sprays. **Am. J. Vet. Res.**, 45: 1008–1010.
- Davey R. B., George J. E. (2002): Efficacy of macrocyclic lactone endectocides against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) infested cattle using different pour-on application treatment regimes. **J. Med. Entomol.**, 39: 763–769.
- Davis L. J. (1929): On a piroplasm of the Sudanese wild cat (*Felis ocreata*). **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 22: 523-534.
- Davoust B., Boni M. (1998): Lyme-disease in dogs-seroepidemiological survey in the south-east of France. **Med. Mal. Infect.**, 28: 408-409.
- Davoust B., Mariè J. L., Mercier S., Boni M., Vandeweghe A., Parzy D., Beugnet F. (2003): Valutazione dell'efficacia del fipronil per la prevenzione dell'ehrlichiosi monolitica canina in zone endemiche. **Vet. Par.**, 112: 91-100.
- Dawson J. E., Warner C. K., Standaert S. & Olson J. G. (1996): The interface between research and the diagnosis of an emerging tick-borne disease, human ehrlichiosis due to *Ehrlichia chaffeensis*. **Arch. Intern. Med.**, 156: 137-142.
- de la Fuente J., Massung R. F., Wong S. J., Chu F. K., Lutz H., Meli M., von Loewenich F. D., Grzeszczuk A., Torina A., Caracappa S., Mangold A. J., Naranjo V., Stuen S., Kocan K.M.

- (2005): Sequence analysis of the msp4 gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. **J. Clin. Microbiol.**, 43(3):1309-1317.
- de Oliveira Monteiro C. M., Furlong J., de Azevedo Prata M. C., Soares A. E., de Paula Batista E. S., Dolinskie C. (2010): Evaluation of the action of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) isolate HP88 on the biology of engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Vet. Par.**, 170: 355–358.
  - De Silva A. M., Fish D., Burkot T. R., Zhang Y., Fikrig E. (1997): OspA antibodies inhibit the acquisition of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes ticks*. **Infect. Immun.**, 65: 3146-3150.
  - De Wall D. T. (1992): Equine piroplasmiasis: a review. **Brit. Vet. J.**, 148: 6–13.
  - Delgado S., Carmenes P. (1995): Seroepidemiological survey for *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease) in dog from northwestern of Spain. **Eur. J. Epidemiol.**, 11: 321-324.
  - Demma L. J., Holman R. C., McQuiston J. H., Krebs J. W., Swerdlow D. L. (2006): Human monocytic **ehrlichiosis** and human granulocytic anaplasmosis in the United States, 2001-2002. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1078: 118-119.
  - Denes E., Rogez J.P., Dardè M.L., Weinbreck P. (1999): Management of *Babesia divergens* babesiosis without a complete course of quinine treatment. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 18: 672-673.
  - Dennig H. K.(1966): The isolation of *Babesia* species from wild animals. **Proc. Ist int. Congr. Parasitol. Rome**. Corradetti A. (ed): Pergamon Press, London, 1966, p 262.
  - Dennig H. K., Centurion C., Göbel E., Weiland G. (1980): Canine babesiosis and its importance in the Federal Republic of Germany and West Berlin. **Berl. Munch Tierarzte Wochenschr**, 93 (19): 373-379.
  - Derdákova M., Stefančíková A., Spitalská E., Taragel'ová V., Košťálová T., Hrk'lová G., Kybicová K., Schánilec P., Majláthová V., Várady M., Peťko B. (2011): Emergence and genetic variability of *Anaplasma* species in small ruminants and ticks from Central Europe. **Vet Microbiol.**, 153(3-4): 293-298.
  - des Vignes F., Piesman J., Heffernan R., Schulze T. L., Stafford K. C. III, Fish D. (2001): Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. **J Infect Dis.**, 183: 773–778.
  - Diaz J. H. (2010): A 60-year meta-analysis of tick paralysis in the United States: a predictable, preventable, and often misdiagnosed poisoning. **J. Med. Toxicol.**, 6(1): 15-21.
  - Divers T. J. (2007): Lyme disease. In Sellon D. C. e Long M. T. (Eds.): **Equine infectious diseases**. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, USA, pp: 310-312.
  - Diza E., Papa A., Vezryi E., Tsounis S., Milonas I., Antoniadis A. (2004): *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid. **Emerg. Infect. Dis.**, 10: 1692–1693.
  - Doby D., Chevrier S., Couatarmanach A. (1988): Tickborne *Borrelia burgdorferi* infection in dogs in western France. Systematic serological survey of 806 hunting dogs and 88 military dogs in 14 departamens. **Rec. Med. Vet.**, 164: 367-374.
  - Doggett J. S., Kohlhepp S., Gresbrink R., Metz P., Gleaves C., Gilbert D. (2008): Lyme disease in Oregon. **J. Clin. Microbiol.**, 46: 2115-2118.
  - Dolan M. C., Maupin G. O., Schneider B. S., Denatale C., Hamon N., Cole C, Zeidner N. S., Stafford K. C. 3rd. (2004): Control of immature *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) on rodent reservoirs of *Borrelia burgdorferi* in a residential community of southeastern Connecticut. **J. Med. Entomol.**, 41: 1043-1054.
  - Donnelly J. (1973): Epidemiology of babesia infection in cattle. **Proc.R. Soc. Med.**, 66: 774-775.
  - Donnelly J., Peirce M. A. (1975): Experiments on the trasmission of *Babesia divergens* to cattle bye the tick *Ixodes ricinus*. **Int. J. Parassitol.**, 5: 363-367.
  - Donnelly J., Mc Kellar J. C. (1970): The effect of weather end season on the incidence of red water fever in cattle in Britain. **Agric. Meteorol.**, 7: 5-17.
  - Drancourt M., Raoult D. (1994): Taxonomic position of the rickettsiae : current knowledge. **FEMS Microbiol. Rev.**, 13: 13-24.
  - Drazenovich N., Foley J., Brown R. N. (2006): Use of Real-Time quantitative PCR targeting

- the msp2 protein gene to identify cryptic *Anaplasma phagocytophilum* infections in wildlife and domestic animals. **Vector-borne Zoon. Dis.**, 1: 83-90.
- Dressler F., Whalen J. A., Reinhardt B. N., Steere A. C. (1993): Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. **J. Infect. Dis.**, 167: 392-400.
  - Duh D., Petrovec M., Avsic-Zupanc T. (2001): Diversity of *Babesia* Infecting European sheep ticks (*Ixodes ricinus*). **J. Clin. Microbiol.**, 39: 3395-3397.
  - Duh D., Petrovec M., Avsic-Zupanc T. (2005a): Molecular characterization of human pathogen *Babesia* EU1 in *Ixodes ricinus* ticks from Slovenia. **J. Parasitol.**, 91, pp 463-465.
  - Duh D., Petrovec M., Bidovec A., Avsic-Zupanc T. (2005b): Cervidae as babesiae hosts, Slovenia. **Em. Inf. Dis.**, 11 (7): 1121-1123.
  - Dumler J. S. (1997): Is human granulocytic ehrlichiosis a new Lyme disease? **Clin. Infect. Dis.**, 25: S43-47.
  - Dumler J. S. (2001): Molecular diagnosis of Lyme disease: Review and meta-analysis. **Mol. Diagn.**, 6: 1-11.
  - Dumler J. S. (2005): *Anaplasma* and *Ehrlichia* infection. **Ann NY Acad Sci.**, 1063: 361-373.
  - Dumler J. S. (2012): The biological basis of severe outcomes in *Anaplasma phagocytophilum* infection. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, 64(1): 13-20.
  - Dumler J. S., Asanovich K. M., Bakken J. S., Richter P., Kimsey R., Madigan J E. (1995): Serologic cross-reaction among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila* and human granulocytic ehrlichia. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 1098-1103.
  - Dumler J. S., Barat N. C., Barat C. E. Bakken J. S. (2007): Human granulocytic anaplasmosis and macrophage activation. **Clin Infect Dis.**, 45: 199-204.
  - Dumler J. S., Barbet A. F., Bekker C. P., Dasch G. A., Palmer G. H., Ray S. C., Rikihisa Y., Rurangirwa F. R. (2001): Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int. J. Syst Evol Microbiol.**, 51: 2145-2165.
  - Dumler J. S., Dotevall L., Gustafson R., Granstrom M. (1997): A population-based seroepidemiologic study of human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis on the west coast of Sweden. **J Infect Dis.**, 175: 720-722.
  - Dumler J. S., Rikihisa Y., Dasch G. A. (2005): Family II. Anaplasmataceae. In Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T. (Eds.): *Bergey's manual of systematic bacteriology*, second edition, Volume two, The Proteobacteria, Springer, N.Y., USA.
  - Dumler J. S., Triggiani E. R., Bakken J. S., Auero-Rosendeld M. E., Wormser G. P. (2000): Serum cytokine responses during acute human granulocytic ehrlichiosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, 7: 6-8.
  - Dunning Hotopp J. C., Lin M., Madupu R., Crabtree J., Angiuoli S. V., Eisen J. A., Seshadri R., Ren Q., Wu M., Utterback T. R., Smith S., Lewis M., Khouri H., Zhang C., Niu H., Lin Q., Ohashi N., Zhi N., Nelson W., Brinkac L.M., Dodson R. J., Rosovitz M. J., Sundaram J., Daugherty S. C., Davidsen T., Durkin A.S., Gwinn M., Haft D. H., Selengut J. D., Sullivan S. A., Zafar N., Zhou L., Benahmed F., Forberger H., Halpin R., Mulligan S., Robinson J., White O., Rikihisa Y., Tettelin H. (2006): Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. **PLoS Genet.**, 2 (2), e21.
  - Earnhart C. G., Marconi R. T. (2007): An octavalent Lyme disease vaccine induces antibodies that recognize all incorporated OspC type-specific sequences. **Hum Vaccin.**, 3: 281-289.
  - Eaton P. (1934): *Piroplasma canis* in Florida. **J. Parasitol.**, 20: 312-313.
  - Ebani V., Cerri D., Fratini F., Ampola M., Andreani E. (2008): Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic and wild animals from central Italy. **New Microbiol.**, 31(3): 371-375.
  - Ebani V. V., Cerri D., Fratini F., Ampola M., Andreani E. (2007): *Anaplasma phagocytophilum* infection in a fallow deer (*Dama dama*) population in a preserve of central Italy. **New Microbiol.**, 30(2):161-165.

- Ebani V. V., Verin R., Fratini F., Poli A., Cerri D. (2011): Molecular survey of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from central Italy. **J Wildl Dis.**, 47(3): 699-703.
- Echaide I. E., Hines S. A., McElwain T. F., Suarez C. E., McGuire T. C., Palmer G. H. (1998): *In vivo* binding of immunoglobulin M to the surface of *Babesia bigemina*-infected erythrocytes. **Infect. Immun.**, 66: 2922-2927.
- Edelman D. C., Dumler J. S. (1996): Evaluation of an Improved PCR Diagnostic Assay for Human Granulocytic Ehrlichiosis. **Mol. Diagn.**, 1: 41-49.
- Egan E. L., Duggan C. (1990): Int. Soc. Haematol. 23<sup>rd</sup> Congress, Am. Soc. Haematol. 32<sup>nd</sup> Annu. Meet. (citato da Zintl e coll., 2003).
- Engvall A., Bjöersdorff A., Lilliehöök I., Olsson Engvall E., Karlstam E., Artursson K., Hedhammar A., Gunnarsson A. (1998): Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish Ehrlichia species isolate. **Vet Rec.**, 143: 412-417.
- Engvall A., Franzén P., Gunnarsson A., Engvall E. O., Vågsholm I., Wikström U. B., Artursson K. (2001): Cross-sectional study of the seroprevalence to *Borrelia burgdorferi* sensu lato and granulocytic *Ehrlichia* spp. and demographic, clinical and tick-exposure factors in Swedish horses. **Prev. Vet. Med.**, 49: 191-208.
- Engvall A., Hedhammar A., Bjoersdorff A. (1997): Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. **Vet. Rec.**, 140: 222-226.
- Engvall A., Lilliehöök I., Bjöersdorff A., Engvall E. O., Karlstam E., Artursson K., Heldtander M., Gunnarsson A. (2000): Detection of granulocytic *Ehrlichia* species DNA by PCR in persistently infected dogs. **Vet. Rec.**, 146: 186-190.
- Eichhorn M., Dobbelaere D. A. E. (1994): Induction of signal transduction pathways in lymphocytes infected by *Theileria parva*. **Parasitol. Today**, 10: 469-472.
- Eiffert H., Ohlenbusch A., Christen HJ, Thomssen R, Spielman A, Matuschka FR. (1995): Nondifferentiation between Lyme disease spirochetes from vector ticks and human cerebrospinal fluid. **J. Infect .Dis.**, 171: 476-479.
- Eiffert H., Karsten A , Thomssen R , Christen H. J. (1998): Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains in Lyme arthritis. **Scand J Infect Dis.**, 30: 265-268.
- Eisen .L, Eisen R. J., Lane R. S. (2004): The roles of birds, lizards, and rodents as hosts for the western black-legged tick *Ixodes pacificus*. **J. Vector. Ecol.**, 29: 295-308.
- Eisendle K., Zelger B. (2009): The expanding spectrum of cutaneous borreliosis. **G. Ital. Dermatol. Venereol.**, 144: 157-171.
- Elfassy O. J., Goodman F. W., Levy S. A., Carter L. L. (2001): Efficacy of an amitraz-impregnated collar in preventing transmission of *Borrelia burgdorferi* by adult *Ixodes scapularis* to dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 219: 185-189
- Ellis J., Hefford C., Baverstock P. R., Dalrymple B. P., Johnson A. M. (1992): Ribosomal DNA sequence comparison of *Babesia* and *Theileria*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 54: 87-96.
- Emerson H. R., Wright W. T. (1968): The isolation of a babesia in white-tailed deer. **Wildl. Dis.**, 4(4): 142.
- Endris R. G., Matthewson M. D., Cooke D., Amodie D. (2002): Repellency and efficacy of 65% permethrin and 9.7% fipronil against *Ixodes ricinus*. **Tierärztliche Umschau**, 57 (10): 556-566.
- Engin A., Elaldi N., Bolayir E., Dokmetas I., Bakir M. (2006): Tick paralysis with atypical presentation: isolated, reversible involvement of the upper trunk of brachial plexus. **Emerg Med J.**, 23 (7).
- Engstrom S. M., Shoop E., Johnson R. C. (1995): Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 419-427.
- Engvall E. O., Engvall A. (2002): Granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses. **Int. J. Med. Microbiol.**, 33: 100-103.
- Entrican J. H., Williams H., Cook I. A., Lancaster W. M., Clark J. C., Joyner L. P., Lewis D. (1979): Babesiosis in man: report of a case from Scotland with observations on the infecting

- strain. **J. Infect.**, 1: 227-234.
- Erbsloh J. K. E. (1975): Babesiosis in the newborn foal. **J. Rep. Fertil.**, 23, pp 725-726
  - Eremeeva M. E., Oliveira A., Robinson J. B., Ribakova N., Tokarevich N. K., Dasch G. A. (2006): Prevalence of bacterial agents in *Ixodes persulcatus* ticks from the Vologda Province of Russia. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1078: 291–298.
  - Ershov V. S. (1956): Parasitology and parasitic diseases of livestock. **Natural Science Foundation and Department of Agriculture**, Washington, USA
  - Eskow E. S., Krause P. J., Spielman A., Freeman K., Aslanzadeh J. (1999): Southern extension of the range of human babesiosis in the eastern United States. **J. Clin. Microbiol.**, 37: 2051-2052.
  - Estrada-Peña A, Ortega C, Sanchez N, DeSimone L, Sudre B, Suk JE, et al. (2011): Correlation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato prevalence in questing *Ixodes ricinus* ticks with specific abiotic traits in the western Palearctic. **Appl. Env. Microbiol.**, 77(11): 3838-3845.
  - Estrada-Peña A., Bouattour A., Camicas J., Walker L.A.R. (2004): Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region. A guide to Identification of Species. (ICTTD2, ed.).
  - Etkind, P., Piesman J., Ruebush II T., Spielman A., Juranek D. D. (1980). Methods for detecting *Babesia microti* infection in wild rodents. **J. Parasitol.**, 66: 107–110
  - European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Factsheet for health professionals (Lyme disease). Updated 16 June 2010. Available from: [http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/tick\\_borne\\_diseases/lyme\\_disease/basic\\_facts/Pages/factsheet\\_health\\_professionals.aspx](http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/tick_borne_diseases/lyme_disease/basic_facts/Pages/factsheet_health_professionals.aspx).
  - Falagas M. E., Klempner M. S. (1996): Babesiosis in patients with AIDS: a chronic infection presenting as fever of unknown origin. **Clin. Infect. Dis.**, 22: 809–812.
  - Favia G., Cancrini G., Carfi A., Grazioli D., Lillini E., Iori A. (2001): Molecular identification of *Borrelia valaisiana* and HGE-like *Ehrlichia* in *Ixodes ricinus* ticks sampled in north-eastern Italy: first report in Veneto region. **Parassitologia**, 43: 143-146.
  - Fawcett D. W., Binnington K., Voigt W. P. (1986): The cell biology of the ixodid tick salivary gland. In: Sauer J.R., Hair J.A. (Eds.) *Morphology, physiology and behavioral biology of ticks*. Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK, 1986, pp. 22-45.
  - Fawcett D. W., Doxsey S., Stagg D. A., Young A. S. (1982): The entry of sporozoites of *Theileria parva* into bovine lymphocytes in vitro: electron microscopic observations. **Eur. J. Cell. Biol.**, 27: 10–21.
  - Fazii P., Ballone E., Ippolito N., Cosentino L., Clerico L., Galella G., Riario Sforza G., Schioppa F. (2000): Survey of Lyme disease in Abruzzo (Italy). **Int J Immunopathol Pharmacol.** 13: 151-156.
  - Feldman-Muhsam B., Borut S. (1971): Copulation in Ixodid ticks. **J. Parassitol.**, 57: 630-634.
  - Feldman-Muhsam B., Borut S. (1978): Further observations on spermatophore formation in Argas ticks. **J. Insect Physiol.**, 24: 693-697.
  - Fell A. H., Preston P. M., Ansell J. D. (1990): Establishment of *Theileria*-infected bovine cell lines in scid mice. **Parasitol. Immunol.** 12: 335–339.
  - Felsheim R. F., Herron M. J., Nelson C. M., Burkhardt N. Y., Barbet A. F., Kurtti T. J., Munderloh U. G. (2006): Transformation of *Anaplasma phagocytophilum*. **BMC Biotechnol.**, 6: 42.
  - Fich C., Klauenberg U., Fleischer B., Broker B. M. (1998): Modulation of enzymatic activity of src-family kinases in bovine T cells transformed by *Theileria parva*. **Parasitology**, 117: 107-115
  - Fingerle V., Goodman J. L., Johnson R. C., Kurtti T. J., Munderloh U. G., Wilske B. (1997): Human granulocytic ehrlichiosis in southern Germany: increased seroprevalence in high-risk groups. **J. Clin. Microbiol.**, 35: 3244–3247.
  - Fingerle V., Munderloh U. G., Liegl G., Wilske B. (1999): Coexistence of ehrlichiae of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. **Med. Microbiol. Immunol.**, 188: 145-149.

- Fish D., Childs J. E. (2009): Community-Based Prevention of Lyme Disease and Other Tick-Borne Diseases Through Topical Application of Acaricide to White-Tailed Deer: Background and Rationale. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 9: 357–364.
- Fitzpatrick J. E. P., Kennedy C. C., McGeown M. G., Oreopoulos D. G., Robertson J. H., Soyannwo M. A. (1969): Further details of the third recorded case of redwater (babesiosis) in man, **Br. Med. J.**, 4: 770.
- Fitzpatrick J. E. P., Kennedy C. C., McGeown M. G., Oreopoulos D. G., Robertson J. H., Soyannwo M. A. (1968): Human case of piroplasmosis (Babesiosis), **Nature**, 217: 861.
- Flisiak I., Schwartz R. A., Chodyncka B. (1999): Clinical features and specific immunological response to *Borrelia afzelii* in patients with acrodermatitis chronica atrophicans. **J Med.**, 30: 267–278.
- Flood P.F., Abrams S.R., Muir G.D., Rowell J.E. (1989): Odor of the muskox. A preliminary investigation. **J. Chem. Ecol.**, 15: 2207–2217.
- Foggie A. (1951): Studies on the infectious agent of tick-borne fever. **J. Pathol. Bacteriol.**, 63: 1–15. (Citato da Woldehiwet, 2010).
- Foggie A. (1956): The effect of tick-borne fever on the resistance of lambs to staphylococci. **J Comp Pathol.**, 66: 278–285.
- Foley J. E., Crawford-Miksza L., Dumler J. S., Glaser C., Chae J. S., Yeh E., Schnurr D., Hood R., Hunter W., Madigan J. F. (1999): Human granulocytic ehrlichiosis in Northern California: two case descriptions with genetic analysis of the Ehrlichiae. **Clin. Infect. Dis.**, 29: 388–392.
- Foley J. E., Foley P., Madigan J. E. (2001): Spatial distribution of seropositivity to the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in dogs in California. **Am J Vet Res.**, 62: 1599–1605.
- Foley J. E., Kramer V. L., Weber D. (2002): Experimental ehrlichiosis in dusky footed woodrats (*Neotoma fuscipes*). **J. Wildl. Dis.**, 38: 194–198.
- Foley J. E., Nieto N. C., Massung R., Barbet A., Madigan J., Brown R. N. (2009): Distinct ecologically relevant strains of *Anaplasma phagocytophilum*. **Emerg. Infect. Dis.**, 15: 842–843.
- Foley J., Drazenovich N., Leutenegger C., Chomel B. B. (2007): Association between polyarthritis and thrombocytopenia and increased prevalence of vectorborne pathogens in Californian dogs. **Vet Rec.**, 160: 159–162.
- Foley J., Nieto N. (2006): *Anaplasma phagocytophilum* subverts tick salivary gland proteins. **Trends in Parasitology**, 23: 3–5.
- Foley J., Nieto N. C., Madigan J., Sykes J. (2008): Possible differential host tropism in *Anaplasma phagocytophilum* strains in the Western United States. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1149: 94–97.
- Foley J.E., Foley P., Brown R. N., Lane R. S., Dumlers J. S., Madigan J. E. (2004): Ecology of granulocytic ehrlichiosis and Lyme disease in the western United States. **J. Vector. Ecol.**, 29: 41–50.
- Foppa I. M., Krause P. J., Spielman A., Goethert H., Gern L., Brand B., Telford S. R. III (2002): Entomologic and serologic evidence of zoonotic transmission of *Babesia microti* in Eastern Switzerland. **Emerg Infect Dis.**, 8: 722–726.
- Fox J. L. (2000): Ehrlichiosis agent blocks apoptosis, preserving host and habitat. **ASM News**, 66: 291.
- Fragoso H., Rad P.H., Ortiz M., Rodriguez M., Redondo M., Herrera L., de la Fuente J. (1998): Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *Boophilus microplus* Bm86-containing vaccine GAVAC. **Vaccine**, 16: 1990–1992.
- Francis J. (1966): Resistance of zebu and other cattle to tick infestation and babesiosis with special reference to Australia: an historical review. **Brit. Vet. J.**, 122: 301–307.
- Franke J., Fritsch J., Tomaso H., Straube E., Dorn W., Hildebrandt A. (2010): Coexistence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat in Central Germany. **Appl. Environ. Microbiol.** 76(20): 6829–6836.
- Franke J., Hildebrandt A., Meier F., Straube E., Dorn W. (2011): Prevalence of Lyme disease

- agents and several emerging pathogens in questing ticks from the German Baltic coast. **J. Med. Entomol.**, 48(2): 441-444.
- Fraser C. M., Casjens S., Huang W. M., Sutton G. G., Clayton R., Lathigra R., White O., Ketchum K. A., Dodson R., Hickey E. K., Gwinn M., Dougherty B., Tomb J. F., Fleischmann R. D., Richardson D., Peterson J., Kerlavage A. R., Quackenbush J., Salzberg S., Hanson M., van Vugt R., Palmer N., Adams M. D., Gocayne J., Weidman J., Utterback T., Watthey L., McDonald L., Artiach P., Bowman C., Garland S., Fuji C., Cotton M. D., Horst K., Roberts K., Hatch B., Smith H. O., Venter J. C. (1997): Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. **Nature**, 390: 580-586.
  - Friedhoff K. T., Ganse-Dumrath D., Weber C. e Muller I. (1989): Epidemiology and control of *Babesia divergens* infections in northern Germany. **Proc. 8th Nat. Vet. Hemoparasite Disease Conf. St. Louis**: 441-449.
  - Friedman A. D. (2007): Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. **Oncogene**, 26: 6816-6828.
  - Fritz C. L., Kjemtrup A. M., Conrad P. A., Flores G. R., Campbell G. L., Schriefer M. E., Gallo D., Vugia D. J. (1997): Seroepidemiology of emerging tickborne infectious diseases in a Northern California community. **J. Infect. Dis.**, 175: 1432-1439.
  - Frusteri L., Khoury C., Maroli M. (1994): Temporal distribution of ticks (Acarina: Ixodidae) in "Macchia Grande" park in Manziana in the province of Rome. **Parassitologia**, 36 (3): 295-300.
  - Fujiwara H., Fujiwara K., Hashimoto K., Mehregan A. H., Schaumburg-Lever G., Lange R., Schempp C., Gollnick H. (1997): Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA (*B. garinii* or *B. afzelii*) in morphea and lichen sclerosus et atrophicus tissues of German and Japanese but not of US patients. **Arch. Dermatol.**, 133: 41-44.
  - Fukumoto S., Tamaki Y., Igarashi I., Suzuki H., Xuan X. (2009): Immunogenicity and growth inhibitory efficacy of the prime-boost immunization regime with DNA followed by recombinant vaccinia virus carrying the P29 gene of *Babesia gibsoni* in dogs. **Exp. Parasitol.**, 123: 296-301.
  - Fukumoto S., Tamaki Y., Okamura M., Bannai H., Yokoyama N., Suzuki T., Igarashi I., Suzuki H., Xuan X. (2007) Prime-boost immunization with DNA followed by are combinant vaccinia virus expressing P50 induced protective immunity against *Babesia gibsoni* infection indogs. **Vaccine**, 25: 1334-1341.
  - Fukumoto S., Tamaki Y., Shirafuji H., Harakawa S., Suzuki H., Xuan X. (2005). Immunization with recombinant surface antigen P50 of *Babesia gibsoni* expressed in insect cells induced parasite growth inhibition in dogs. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, 12: 557-559.
  - Fukunaga M., Okada K., Nakao M., Konishi T., Sato Y. (1996): Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borreliae. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 46: 898-905.
  - Furman D. P., Loomis E. C. (1984): The ticks of California (Acari:Ixodida), 25 Berkeley, CA: University of California Press.
  - Gabrielli S., Galuppi R., Marcer F., Marini C., Tampieri M. P., Moretti A., Cancrini G., Pietrobelli M. (2010): Development of serological tools to diagnose *Babesia divergens* infections in animals and humans. **Parassitologia**, 52: 315.
  - Galley Y., Hagens G., Glaser I., Davis W., Eichhorn M., Dobbelaere D. (1997): Jun NH2-terminal kinase is constitutively activated in T cells transformed by the intracellular parasite *Theileria parva*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94: 5119-5124.
  - Galuppi R., Bonoli C., Aureli S., Cassini R., Marcer F., Foley J. E., Tampieri M. P. (2011). Comparison of diagnostic methods to detect piroplasms in asymptomatic cattle. **Vet Parasitol.** Jul 27.
  - Garbe C., Stein H., Gollnick H., Taud W., Orfanos C. E. (1988): Cutaneous B cell lymphoma in chronic *Borrelia burgdorferi* infection. Report of 2 cases and a review of the literature [in German]. **Hautarzt**, 39: 717-726. Citato da Bhate C. e Schwartz R. A. (2011).
  - Garboui S. S., Jaenson T. G., Palsson K. (2006): Repellency of MyggA Natural spray (para-



- menthane-3,8-diol) and RB86 (neem oil) against the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in the field in east-central Sweden. **Exp. App. Acarol.**, 40 (3-4): 271-277.
- Garcia-Garcia J. C., Rennoll-Bankert K. E., Pelly S., Milstone A. M., Dumler J. S. (2009): Silencing of host cell CYBB gene expression by the nuclear effector AnkA of the intracellular pathogen *Anaplasma phagocytophilum*. **Infect Immun.**, 77: 2385–2391.
  - García-Sanmartín J., Aurteneixe O., Barral M., Marco I., Lavin S., García-Pérez A. L., Hurtado A. (2007): Molecular detection and characterization of piroplasms infecting cervids and chamois in Northern Spain. **Parasitology**, 134(Pt 3): 391-398.
  - Garippa G. (2010): Parassiti degli ovini e dei caprini. In: Taylor M. A., Coop R. L. e Wall R. L. (Eds) Parassitologia e malattie parassitarie degli animali. EMSI, Roma, Italia, pp: 152-260
  - Garnham P. C. C., Donnelly J., Hoogstraal H., Kennedy C. C., Walton G. A. (1969): Human babesiosis in Ireland: further observations and the medical significance of this infection. **Br. Med. J.**, 4: 768-770.
  - Garyu J. W. A., Choi K. S., Grab D. J., Dumler J. S. (2005): Defective phagocytosis in *Anaplasma phagocytophilum*-infected neutrophils. **Infect. Immun.**, 73: 1187–1190.
  - Gauci M., Loh R. K., Stone B. F., Thong Y. H. (1989): Allergic reactions to the Australian paralysis tick, *Ixodes holocyclus*: diagnostic evaluation by skin test and radioimmunoassay. **Clin. Exp. Allergy**, 19: 279-283.
  - Geissmann F., Auffray C., Palframan R., Wirrig C., Ciocca A., Campisi L., Narni-Mancinelli E., Lauvau G. (2008): Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. **Immunol. Cell Biol.**, 86: 398-408.
  - Genchi C. (1996): Tick-transmitted disease. **Proceedings International Forum on Fleas and Ticks Control**, Rhone-Merieux: 25-34.
  - Genchi C., Manfredi M.T. (1999): Tick species infesting ruminants in Italy: ecological and bio-climatic factors affecting the different regional distribution. **Parassitologia**, 41 (Suppl. 1): 41-45.
  - Genchi C., Rizzoli A., Rosà R., Nicolini G., Pugliese A. (2000): Ecologia e modellistica delle malattie trasmesse da zecche. **Report Centro di Ecologia Alpina**, Trento, 2000, 21: 42-48.
  - George J. E., Davey R. B., Ahrens E. H., Pound J. M., Drummond R. O. (1998). Efficacy of amitraz (Taktic® 12.5% EC) as a dip for the control of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) on cattle. **Prev. Vet. Med.**, 37: 55–67.
  - George J. E., Pound J. M. And Davey R. B. (2008): Acaricides for controlling ticks on cattle and the problem of acaricide resistance. In: Bowman A. S. and Nuttal P. A. (Eds.) **Ticks Biology, Disease and Control**. Cambridge University press, New York, USA, 2008, pp 408-423.
  - George, J. E. Davey R. B. (2004). Therapeutic and persistent efficacy of a single application of doramectin applied either as a pour-on or injection to cattle infested with *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, 41: 402–407.
  - Gerber M. A., Shapiro E. D., Krause P. J., Cable R. G., Badon S. J., Ryan R. W. (1994): The risk of acquiring Lyme disease or babesiosis from a blood transfusion. **J. Infect. Dis.**, 170: 231-234.
  - Gern L. (1994): Certainty and uncertainty about ecology, epidemiology and control of Lyme borreliosis. Advances in Lyme Borreliosis research. **Proc. IV Int Conf Lyme Borreliosis**, 1994, pp. 199-204.
  - Gern L. (2008): *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the agent of lyme borreliosis: life in the wilds. **Parasite**, 15(3): 244-247.
  - Gern L., Douet V., López Z., Rais O., Cadenas F. M. (2010): Diversity of *Borrelia* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in a Lyme borreliosis endemic area in Switzerland identified by using new probes for reverse line blotting. **Ticks Tick Borne Dis.**, 1(1):23-29.
  - Gfeller R. W., Messonnier S. P. (2004): Tossicologia ed avvelenamenti nei piccoli animali. Traduzione italiana a cura di Formato G. e Ronconi C., Poletto Editore srl., Milano, 2005, pp. 141-142.
  - Ghirotti M., Maroli M. (1997): Ticks and tick-borne diseases as a constraint to sheep and goat

- production in Italy. Selected features. **Parassitologia**, 39: 111-114.
- Giangaspero A. (1999): L'infestazione da zecche nei cani e gatti. **Obbiettivi e documenti Veterinari**, 10: 5-18.
  - Giangaspero A., Otranto D. (2010): Ectoparassiti ed artropodi vettori. In Taylor M. A., Coop R. L., Wall R. L. (Eds.), *Parassitologia e malattie parassitarie degli animali*, EMSI, Roma, Italia, 2010, pp: 679-754.
  - Gibson M. D., Omran M. T., Young C. R. (1995): Experimental feline Lyme borreliosis as a model for testing *Borrelia burgdorferi* vaccines. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 383: 73-82.
  - Gilmour J. L., Brodie T. A., Holmes P. H. (1982): Tick-borne fever and pasteurellosis in sheep. **Vet Rec.**, 111: 512.
  - Gilot B., Laforge M.L., Cabassu J.P., Romani M. (1992): Elements pour la cartographie ecologique des populations de *Rhipicephalus* du groupe *sanguineus* dans l'agglomération marseillaise, en relation avec les diverses formes d'urbanisation. **Acarologia**, 33: 17-33.
  - Gilot B., Pautou G., Moncada E. (1975): L'analyse de la vegetation appliqué a la detection des populations tiques exophiles dans le sud-est de la France: l'exemple d'*Ixodes ricinus*. **Acta Tropicalis**, 32: 232-258.
  - Gilot B., Pautou G., Moncada E., Ain G., Lachet B., Christin J. G. (1979): La cartographie des populations de tiques exophiles par la biais de la vegetation: bases ecologiques, intérêt epidemiologique. **Doc. Cartogr. Ecol.**, 22: 65-80.
  - Ginsberg H. S., Stafford K. C. (2005): Forum: Management of Ticks and Tick-Borne Diseases. In: Goodman J. L., Dennis D. T., Sonenshine D.E. (Eds.) **Tick-Borne Diseases of Humans**. Asm Press, Washington DC, pp. 65-86
  - Girard Y. A., Fedorova N., Lane R. S. (2010): Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* and detection of *B. bissetti*-like DNA in serum of north-coastal California residents. **J. Clin. Microbiol.** [Epub ahead of print] doi:10.1128/JCM.01689-10.
  - Girschick H. J., Morbach H., Tappe D. (2009): Treatment of Lyme borreliosis. **Arthritis Res Ther.**, 11(6):258.
  - Giudice E., Domina F., Britti D., Di Pietro S., Pugliese A. (2003): Clinical findings associated with *Borrelia burgdorferi* infection in the dog. **Vet Res Commun.**, 27 (Suppl 1): 767-770.
  - Giudice E., Giannetto C., Furco V., Alongi A., Torina A. (2012): Anaplasma phagocytophilum seroprevalence in equids: a survey in Sicily (Italy). **Parasitol. Res.** Feb 24. [Epub ahead of print].
  - Giudice E., Giannetto C., Torina A., Ganesella M. (2011): *Anaplasma Phagocytophilum* intragranulocytic morulae in aborting sheep: a herd case in Sicily. **Transbound Emerg Dis.**, 58(3):263-7.
  - Glass E. J., Innes E. A., Spooner R. L., Brown C. G. D. (1989): Infection of bovine monocyte/macrophage populations with *Theileria annulata* and *Theileria parva*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 22: 355-368.
  - Glass E. J., Jensen K. (2007): Resistance and susceptibility to a protozoan parasite of cattle-gene expression differences in macrophages from different breeds of cattle. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 120: 20-30.
  - Glass E. J., Spooner R. L. (1990): Parasite-accessory cell interactions in theileriosis. Antigen presentation by *Theileria annulata*-infected macrophages and production of continuously growing antigen-presenting cell lines. **Eur. J. Immunol.**, 20: 2491-2497.
  - Glenn B. L., Stair E. L. (1984): Cytauxzoonosis in domestic cats: report two cases in Oklahoma, with a review and discussion of the disease. **JAVMA**, 184: 822-825.
  - Goble F. C. (1966): Pathogenesis of blood protozoa. In: Soulsby E.J. L. (Ed.) *Biology of parasites*. Academic Press, London, UK, pp 237-254.
  - Godfroid E., Min H. C., Humair P. F., Bollen A., Gern L. (2003): PCR-reverse line blot typing method underscores the genomic heterogeneity of *Borrelia valaisiana* species and suggests its potential involvement in Lyme disease. **J. Clin. Microbiol.**, 41: 3690-3698.
  - Goethert H.K., Telford S.R. III (2003): Enzootic transmission of *Babesia divergens* among cottontail rabbit on Nantucket Island, Massachusetts. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 69: 455-460.

- Goetz N., Kaba G., Good D., Hussler G., Bore P. (1988): Detection and identification of volatile compounds evolved from human hair and scalp using headspace gas chromatography. **J. Soc. Cosm. Chem.**, 39: 1–13.
- Goff W. L., Jessup D. A., Waldrup K. A., Thomford J. W., Conrad P. A., Boyce W. M., Gorham J. R., Wagner G. G. (1993): The isolation and partial characterization of a *Babesia* spp. from desert bighorn sheep (*Ovis canadensis nelsoni*). **J. Eukaryot Microbiol.**, 40: 237–243.
- Goff W. L., Johnson W. C., Parish S. M., Barrington G. M., Tuo W., Valdez R. A. (2001): The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. **Parasite Immunol.**, 23: 463–471.
- Gokce H. I., Woldehiwet Z. (2002): Production of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and reactive nitrogen intermediates by ovine peripheral blood leucocytes stimulated by *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila*. **J. Comp. Pathol.**, 126: 202–211.
- Gokce H. I., Woldehiwet Z., (1999): Differential haematological effects of tick-borne fever in sheep and goats. **J. Vet. Med.**, 46: 105–115.
- Goldman M., Rosenberg A. S. (1974): Immunofluorescence studies of the small *Babesia* species of cattle from different geographical areas. **Res. Vet. Sci.**, 16: 351–354.
- Golubic D., Rijpkema S., Tkalec-Makovec N., Ruzic E. (1998): Epidemiologic, ecologic and clinical characteristics of Lyme borreliosis in northwest Croatia. **Acta Med. Croatica**, 52: 7–13.
- Gonzales, J. C., Muniz R. A., Farias A., Goncalves L. C. B., Rew R. S. (1993). Therapeutic and persistent efficacy of doramectin against *Boophilus microplus* in cattle. **Vet. Par.**, 49: 107–109.
- Goodman J. L., Nelson C. M., Klein M. B., Hayes S. F., Weston B. W. (1999): Leukocyte infection by the granulocytic ehrlichiosis agent is linked to expression of a selectin ligand. **J Clin Invest.**, 103: 407–412.
- Goodman J. L., Nelson C., Vitale B., Madigan J. E., Dumler J. S., Kurtti T.J. e Munderloh U. G. (1996). Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. **N. Engl. J. Med.**, 334: 209–215.
- Goossens H. A., van den Bogaard A. E., Nohlmans M. K. (2001): Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in the Netherlands. **J. Clin. Microbiol.**, 39: 844–848.
- Gordon W. S., Brownlee A., Wilson D .R. (1940): Studies on louping ill, tickborne fever and scrapie. In: **Proc. 3rd Int. Congr. Microbiol.**, p. 362.
- Gordon W. S., Brownlee A., Wilson D. R., MacLeod J. (1932): “Tick-borne fever” (A hitherto undescribed disease of sheep). **J. of Comp. Path.**, 45: 301–307. Citato da Woldehiwet Z., 2010.
- Gorenflot A., Bazin C., Ambroise-Tomas P. (1987): Babesioses humaines: traitement des formes graves. **Presse Med.**, 16: 1099.
- Gorenflot A., Moubri K., Precigout E., Carcy B., Schetters T. P. (1998): Human babesiosis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 92: 489–501.
- Gothe R., Kunze K., Hoogstraal H. (1979): The mechanism of pathogeincity in the tick paralysis. **J. Med. Entomol.**, 16, pp. 357–369.
- Gould E. A., Higgs S. (2009): Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. **Tran. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 103: 109–121.
- Graham O. H., Hourrigan, J. L. (1977). Eradication programs for the arthropod parasites of livestock. **J. Med. Entomol.**, 13: 629–658.
- Grange F., Wechsler J., Guillaume J. C., Tortel J., Tortel M. C., Audhuy B., Jaulhac B., Cerroni L. (2002): *Borrelia burgdorferi* associated lymphocytoma cutis simulating a primary cutaneous large B-cell lymphoma. **J. Am. Acad. Dermatol.**, 47: 530–534.
- Granick J. L., Reneer D. V., Carlyon J. A., Borjesson DL. . (2008): *Anaplasma phagocytophilum* infects cells of the megakaryocyte lineage through sialyated ligands but fails to alter platelet production. **J Med Microbiol.**, 57: 416–423.
- Granquist E. G., Bårdsen K., Bergström K., Stuen S. (2010a): Variant -and individual

- dependent nature of persistent *Anaplasma phagocytophilum* infection. **Acta Vet Scand.**, 52: 25.
- Granquist E. G., Stuen S., Lundgren A. M., Bråten M., Barbet A. F. (2008): Outer membrane protein sequence variation in lambs experimentally infected with *Anaplasma phagocytophilum*. **Infect Immun.**, 76: 120–126.
  - Granquist, E. G., Aleksandersen M., Bergström K., Dumler S. J., Torsteinbø W. O., Stuen S. (2010b): A morphological and molecular study of *Anaplasma phagocytophilum* transmission events at the time of *Ixodes ricinus* tick bite. **Acta Vet. Scand.** 52:43.
  - Grauer G. F., Burgess F. C., Cooley A. J., Hagee J. H. (1998): Renal lesions associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 193: 237-239.
  - Gray D., Webster K., Berry J. E. (1988): Evidence of louping ill and tickborne fever in goats. **Vet. Rec.**, 122: 66.
  - Gray J. S. (1980): Studies on the activity of *Ixodes ricinus* in relation to the epidemiology of babesiosis in Co Meath, Ireland. **Br. Vet. J.**, 136. 427-436.
  - Gray J. S. (1999): Tick-borne pathogen interactions. **Infect. Dis. Rev.**, 1: 117-119.
  - Gray J. S. (2006): Identity of the causal agents of human babesiosis in Europe. **Int. J. Med. Microbiol.**, 296(40): 131-136.
  - Gray J. S. (2008): *Ixodes ricinus* seasonal activity: implications of global warming indicated by revisiting tick and weather data," **Int. J. Med. Microbiol.**, 298, supplement 1: 19–24,
  - Gray J. S., Gannon P. (1992): Preliminary development of a live drug-controlled vaccine against bovine babesiosis with the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. **Vet. Par.**, 42: 179-188.
  - Gray J. S., Kaye B., Talty P. J., McSweeney C. (1995): The field use of a gerbil-derived and drug-controlled live vaccine against bovine babesiosis in Ireland. **Ir. Vet. J.**, 48: 358–362.
  - Gray J. S., Langley R. J., Brophy P. O. e Gannon P. (1989): Vaccination against bovine babesiosis with drug-controlled live parasites. **Vet. Rec.**, 125: 369–372.
  - Gray J. S., Murphy T. S. (1985): Bovine Babesiosis in Ireland. **Ir. Vet. News**, pp 9-14.
  - Gray J. S., Potgieter F. T (1981): The retention of *Babesia bigemina* infection by *Boophilus decoloratus* exposed to imidocarb dipropionate during engorgement. **Onderest. J. Vet. Res.**, 48: 225-227.
  - Gray J.S., Dautel H., Estrada-Peña A., Kahl A., Lindgren E. (2009): Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, 1-12.
  - Greco F., Vallone A., Apuzzo G., Vallone G., Tenuta R., Guaglianone L., Giraldi C. (2003): Presence and indigenous nature of Lyme disease in southern Italy. **New Microbiol.**, 26: 391-394.
  - Green C. E., Straubinger R. K. (2006): Borreliosis. In In Greene C. G. (Ed): **Infectious diseases of the dog and the cat**. Third edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, USA, pp:417-435.
  - Gregson J. D. (1973): Tick paralysis: an appraisal of natural and experimental data. **Monography No.9**. Canada department of Agriculture, Kamloops, Canada.
  - Greig B., Armstrong P. J. (2006): Canine granulocytotropic anaplasmosis (*A. phagocytophilum* infection). In Greene C. G. (Ed): **Infectious diseases of the dog and the cat**. Third edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, USA, pp: 219-224.
  - Greig B., Asanovich K. M., Armstrong P. J., Dumler J. S. (1996a): Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. **J Clin Microbiol.**, 34: 44–48.
  - Greig B., Frigo E., Nelson P. M., (1996b): Seroprevalence of a newly emerging zoonotic granulocytic ehrlichial disease in Minnesota and Wisconsin dogs. Abstract # 126. **J. Am. Coll. Vet. Intern. Med.**, 10: 180.
  - Grellier P., Santus R., Mouray E., Agmon V., Mazière J. C., Rigomier D., Dagan A., Gatt S., Schrével J. (1997): Photosensitized inactivation of *Plasmodium falciparum*- and *Babesia divergens* infected erythrocytes in whole blood by lipophilic pheophorbide derivatives. **Vox**

- Sanguinis**, 72: 211–220.
- Grellier P., Valentin A., Millerioux V., Schrevel J., Rigomier D. (1994): 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors lovastatin and simvastatin inhibit in vitro development of *Plasmodium falciparum* and *Babesia divergens* in human erythrocytes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 38: 1144–1148.
  - Gribble D. H. (1969): Equine ehrlichiosis. **J. Am. Vet. Assoc.**, 155: 462–469.
  - Grimm D., Tilly K., Byram R., Stewart P. E., Krum J. G., Bueschel D. M., Schwan T. G., Policastro P. F., Elias A. F., Rosa P. A. (2004): Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 101: 3142–7.
  - Grønstøl H., Øverås J. (1980): Listeriosis in sheep. Tick-borne fever used as a model to study predisposing factors. **Acta Vet Scand.**, 21: 533–545.
  - Grootenhuys J. G., Young A. S., Dolan T. T., Stagg D. A. (1979): Characteristic of *Theileria* species (Eland) infection in eland and cattle. **Res. Vet. Sci.**, 27: 59–68.
  - Groves M. G., Vanniasingham J. A. (1970): Treatment of B. gibsoni infection with phenamidine isethionate. **Vet. Rec.**, 86: 8–10.
  - Gruntar I., Malovrh T., Murgia R., Cinco M. (2001): Conversion of *Borrelia garinii* cystic forms to motile spirochetes in vivo. **APMIS**, 109: 383–388.
  - Grygorczuk S., Zajkowska J., Kondrusik M., Moniuszko A., Pancewicz S., Pawlak-Zalewska W. (2008): Failures of antibiotic treatment in Lyme arthritis [in Polish]. **Przegl. Epidemiol.**, 62: 581–588. Citato da Bhate C. e Schwartz R. A. (2011).
  - Grzeszczuk A., Karbowiak G., Ziarko S., Kovalchuk O. (2006): The root-vole *Microtus oeconomus* (Pallas, 1776): a new potential reservoir of *Anaplasma phagocytophilum*. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, 6: 240–243.
  - Guglielmone A. A., Robbins R. G., Apanaskevich D. A., Petney T. N., Estrada-Peña A., Horak I. G., Shao R., Barker S. C. (2010): The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, 2528: 1–28.
  - Gunders A. E. (1977): Piroplasm sporozoites in the argasid *Ornithodoros erraticus* (Lucas). **Experientia**, 33: 892–893.
  - Gustafson J. M., Burgess E. C., Wachal M. D., Steinberg H. (1993): Intrauterine transmission of *Borrelia burgdorferi* in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, 54: 882–890.
  - Gustafson R., Gardulf A., Svenungsson B. (1989): Comparison of culture, indirect immunofluorescence and dark-field microscopy for detection of spirochetes from *Ixodes ricinus* ticks. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 8: 570–572.
  - Haake D. A. (2000): Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, 146: 1491–1504.
  - Hahn C. N., Mayhew I. G., Whitwell K. E., Smith K. C., Carey D., Carter S. D., Read R. A. (1996): A possible case of Lyme borreliosis in a horse in the UK. **Equine Vet. J.** 28: 84–88.
  - Hajek A. E., Geotzel M. S. (2000): Guidelines for evaluating effects of entomopathogens on non-target organisms. In: Lacey LA Kaya HK (Eds.) **Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**. Kluwer, Dordrecht, pp. 847–868
  - Hale T. K., Myers C., Maitra R., Kolzau T., Nishizawa M., Braithwaite A. W. (2000): Maf transcriptionally activates the mouse p53 promoter and causes a p53-dependent cell death. **J. Biol. Chem.**, 275: 17991–17999.
  - Hall T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, 41: 95–98.
  - Hall W. T. K. (1960): The immunity of calves to *Babesia argentina* infection. **Aust. Vet. J.**, 36: 361–366.
  - Haller D., Mackiewicz M., Gerber S., Beyer D., Kullmann B., Schneider I., Ahmed J. S., Seitzer U. (2010): Cytoplasmic sequestration of p53 promotes survival in leukocytes transformed by *Theileria*. **Oncogene**, 29: 3079–3086.
  - Hansen K., Lebech A. M. (1991): Lyme neuroborreliosis: a new sensitive diagnostic assay for intrathecal synthesis of *Borrelia burgdorferi*-specific immunoglobulin G, A, and M. **Ann.**

- Neurol.**, 30: 197-205.
- Hansen M. G., Christoffersen M., Thuesen L. R., Petersen M. R., Bojesen A. M. (2010): Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in Danish horses. **Acta Vet. Scand.**, 52: 49.
  - Hardalo C. J., Quagliarello V., Dumler J. S. (1995): Human granulocytic ehrlichiosis in Connecticut: report of a fatal case. **Clin. Infect. Dis.**, 21: 910-914.
  - Hartelt K., Oehme R., Frank H., Brockmann S. O., Hassler D., Kimming P. (2004): Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp. And *Babesia* sp. In southern Germany. **Int. J. Med. Microbiol.**, 293: 86-92.
  - Hartelt K., Pluta S., Oehme R., Kimmig P. (2008): Spread of ticks and tick-borne diseases in Germany due to global warming. **Parasitol. Res.**, 103: S109–116.
  - Harvey J. W., Taboada J., Lewis J. C. (1988): Babesiosis in a litter of pups. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 192: 1751–1752.
  - Harwood R. F., James M. T. (1979): Entomology in human and animal health. MacMillan Publishing Co., New York, USA.
  - Häselbarth K., Tenter A. M., Brade V., Krieger G., Hunfeld K.P (2007): First case of human babesiosis in Germany – Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. **Int. J. Med. Microbiol.**, 297: 197-204.
  - Hashemi-Fesharki R (1991) Chemotherapeutic value of parvaquone and buparvaquone against *Theileria annulata* infection of cattle. **Res. Vet. Sci.**, 50: 204-207.
  - Hayes E. B., Piesman J. (2003): How can we prevent Lyme disease. **The New England Journal of Medicine**, 348: 2424–2430.
  - Hayes S. F., Burgdorfer W. (1993): Ultrastructure of *Borrelia burgdorferi*. In Weber K, Burgdorfer W. (Eds.), Aspects of Lyme borreliosis, Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp: 29-43. Citato da Aguero-Rosenfeld e coll., 2005.
  - Healy G. R., Ristic M. (1988): Human babesiosis. In: Ristic M. (Ed) Babesiosis of Domestic Animals and Man. CRC Press, Inc. Boca Raton Floride: pp 209-225
  - Healy G. R., Spielman A., Gleason N. (1976): Human babesiosis: reservoir of infection on Nantucket Island. **Science** 19: 479–480.
  - Hechemy K. E., Samsonoff W. A., Harris H. L., McKee M. (1992): Adherence and entry of *Borrelia burgdorferi* in Vero cells. **J. Med. Microbiol.**, 36: 229–238.
  - Hegde S. P., Zhao J., Ashmun R. A., Shapiro L. H. (1999): C-maf induces monocytic differentiation and apoptosis in biopotent myeloid progenitors. **Blood**, 94: 1578-1589.
  - Heikkilä H. M., Bondarenko A, Mihalkov A, Pfister K, Spillmann T. (2010): *Anaplasma phagocytophilum* infection in a domestic cat in Finland: Case report. **Acta Vet Scand.**, 52: 62.
  - Hellerstrom S. (1930): Erythema chronicum migrans Afzelii. **Acta Derm. Venereol. (Stockh)**, 11: 315-321. Citato da Bhate C., Schwartz R. A., 2011.
  - Henning M. W. (1956): Animal diseases in South Africa. 3<sup>rd</sup> ed. Central News Agency, Pretoria, South Africa, pp 537-561.
  - Hercogová J. (2002): *Borrelia burgdorferi*: a protagonist in Lyme disease, a bystander in morphea? **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, 16: 98-99.
  - Herron M. J., Ericson M. E., Kurtti T. J. e Munderloh U. G. (2005): The interactions of *Anaplasma phagocytophilum*, endothelial cells, and human neutrophils. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1063: 374–382.
  - Herron M. J., Nelson C. M., Larson J., Snapp K. R., Kansas G. S., Goodman J. L. (2000): Intracellular parasitism by the human granulocytic ehrlichiosis bacterium through the P-selectin ligand, PSGL-1. **Science**, 288: 1653–1656.
  - Herwaldt B. L., Cacciò S., Gherlinzoni F., Aspöck H., Slemenda S. D., Piccalunga P., Martinelli G., Edelhofer R., Hollstein U., Poletti G., Pampiglione S., Loschenberger K., Tura S. e Pieniazek N (2003): Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. **Emerging Infectious Disease**, 9: 942-948.
  - Herwaldt B. L., de Bruyn G., Pieniazek N. J., Homer M., Lofy K. H., Slemenda S. B., Fritsche T. R., Persing D. H., Limaye A. P. (2004): *Babesia divergens*-like infection, Washington State.

- Emerg. Infect. Dis.**, 9: 942-948.
- Herwaldt B. L., Kjemtrup A. M., Conrad P. A., Barnes R. C., Wilson M., McCarthy M. G., Sayers M. H. e Eberhard M. L. (1997): Transfusion-transmitted babesiosis in Washington State: first reported case caused by a WA-1 type parasite. **J. Infect. Dis.**, 175: 1259-1262.
  - Herwaldt B. L., Persing D. H., Precigout E. A., Goff W. L., Mathiesen D. A., Taylor P. W., Eberhard M. L., Gorenflot A. F.(1996): A fatal case of babesiosis in Missouri. Identification of another piroplasm that infects humans. **Ann. Intern. Med.**, 124: 643–650.
  - Herxheimer K., Hartmann K. (1902): Ueber Acrodermatitis chronic atrophicans. **Arch. F. Dermatol. U. Syph.**, 61: 57-76. Citato da Bhate C., Schwartz R. A., 2011.
  - Hildebrandt A., Pauliks K., Sachse S., Straube E. (2010): Coexistence of *Borrelia* spp. and *Babesia* spp. In *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany. **Vector-borne Zoon. Dis.**, 9: 831-837.
  - Hillyard P. (1996): Ticks of North-West Europe. Natural History Museum, London, U.K., pp. 178.
  - Hilpertshauser H., Deplazes P., Schnyder M., Gern L., Mathis A. (2006): *Babesia* spp. Identified by PCR in ticks collected from domestic and wild ruminants in Souther Switzerland. **App. Envir. Microbiol.**, 72: 6503-6507.
  - Hoby S., Robert N., Mathis A., Schmid N., Meli M. L., Hofmann-Lehmann R., Lutz H., Deplazes P., Ryser-Degiorgis M. P. (2007): Babesiosis in free-ranging chamois (*Rupicapra r. rupicapra*) from Switzerland. **Vet Parasitol.**, 148(3-4): 341-345.
  - Hödl S., Soyer H., Müllegger R. (1996): Dermatopathologic diagnosis of Lyme borreliosis. **Acta Derm Venereol (Ljubljana)**. 5: 123-9.
  - Hodzic E., Borjesson D. L., Feng S. e Barthold S.W. (2001): Acquisition dynamics of *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis at the host-vector interface. **Vector Borne Zoonotic Dis.** 1: 149–158.
  - Hodzic E., Fish D., Maretzki C. M., De Silva A. M., Feng S., Barthold S.W. (1998a): Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks. **J. Clin. Microbiol.**, 36: 3574–3578.
  - Hodzic E., Ijdo J. W., Feng S., Katavolos P., Sun W., Maretzki C. H., Fish D., Fikrig E., Telford S. R. 3rd, Barthold S. W. (1998b): Granulocytic ehrlichiosis in the laboratory mouse. **J Infect Dis.**, 177: 737–745.
  - Hofmeister E. K., Kolbert C. P., Abdulkarim A. S., Magera J. M., Hopkins M. K., Uhl J. R., Ambyaye A., Telford S. R. III, Cockerill F. R. III, Persing D. H. (1998): Cosegregation of a novel *Bartonella* species with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* in *Peromyscus leucopus*. **J. Infect. Dis.**; 177: 409–416.
  - Holman P. J., Becu T., Bakos E., Polledo G., Cruz D., Wagner G. G. (1998): *Babesia equi* field isolates cultured from horse blood using a microcentrifuge method. **J. Parasitol**, 84: 696-699.
  - Holman P. J., Frerichs W. M., Chieves L., Wagner G. G. (1993): Culture confirmation of the carrier status of *Babesia caballi*-infected horses. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 698-701.
  - Holman P. J., Spencer A. M., Droleskey R. E., Goethert H. K., Telford S.R.III (2005): *In vitro* cultivation of a Zoonotic *Babesia* sp. Isolated from Eastern Cottontail Rabbit (*Sylvilagus floridanus*) on Nantucket Island, Massachussets. **Journal of Clinical Microbiology**, 43: 3995-4001.
  - Homer M. J., Aguilar-Delfin I., Telford III S. R., Krause P. J., Persing D. H. (2000): Babesiosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, 13(3): 451-496.
  - Horowitz H. W., Aguero-Rosenfeld M. E., Dumler J. S., McKenna D. F., Hsieh T. C., Wu J., Schwartz I., Wormser G. P. (1998b): Reinfection with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. **Ann Intern Med.**, 129: 461–463.
  - Horowitz H. W., Hsieh T. C., Aguero-Rosenfeld M. E., Chowdhury I., Wormser G. P., Wu J. M. (2001): Antimicrobial susceptibility of *Ehrlichia phagocytophila*. **Antimicrob Agents Chemother.**, 45: 786–788.
  - Horowitz H. W., Marks S. J., Weintraub M., Dumler J. S. (1996): Brachial plexopathy associated with human granulocytic ehrlichiosis. **Neurology**, 46:1026–1029.
  - Horowitz H.W., Aguero-Rosenfeld M. E., McKenna D. F., Holmgren D., Hsieh T. C., Varde S.

- A., Dumler S. J., Wu J. M., Schwartz I., Rikihisa Y., Wormser G. P. (1998b): Clinical and laboratory spectrum of culture-proven human granulocytic ehrlichiosis: comparison with culture-negative cases. **Clin Infect Dis.**, 27: 1314–17.
- Hovius J. W., Hovius K. E., Oei A., Houwers D. J., van Dam A. P. (2000): Antibodies against specific proteins of and immobilizing activity against three strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato can be found in symptomatic but not in infected asymptomatic dogs. **J. Clin. Microbiol.**, 38: 2611-2621.
  - Hovius K. E., Stark L. A. M., Bleumink-Pluym N. M. C., van de Pol I., Verbeek-de Kruif N., Rijpkema S. G., Schouls L. M., Houwers D. J. (1999): Presence and distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in internal organs and skin of naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs as detected by polymerase chain reaction. **Vet. Q**, 21: 54-58.
  - Hoyte H. M. D. (1976): The tick-fever parasites of cattle. **Proceeding of the Royal Society of Queensland**, 87: V-XII.
  - Hsu N. H., Cross J. H. (1977): Serologic survey for human babesiosis on Taiwan. **Taiwan I. Hsueh. Hui. Tsa. Chilh.**, 76: 950-954.
  - Hu L. T., Klempner M. S. (1997): Host-pathogen interactions in the immunopathogenesis of Lyme disease. **J. Clin. Immunol.**, 17: 354–365.
  - Hu R., Hyland K.E., Oliver J.H. (1998): A review on the use of *Ixodiphagus wasps* (Hymenoptera: Encyrtidae) as natural enemies for the control of ticks (Acari: Ixodidae). **Syst Appl Acarol.**, 3: 19-28.
  - Huang H., Lin M., Wang X., Kikuchi T., Mottaz H., Norbeck A., Rikihisa Y. (2008): Proteomic analysis of and immune responses to *Ehrlichia chaffeensis* lipoproteins. **Infect. Immun.**, 76: 3405–3414.
  - Hubalek Z. (2009): Epidemiology of Lyme borreliosis. **Curr. Probl. Dermatol.**, 37: 31-50.
  - Hubalek Z., Halouzka J. (1997): Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. **Eur. J. Epidemiol.**, 13: 951– 957.
  - Hubálek Z., Stunzner D., Halouzka J., Sixl W., Wendelin I., Juricová Z., Sanogo Y. O. (2003): Prevalence of borreliae in ixodid ticks from a floodplain forest ecosystem. **Wien Klin. Wochenschr.**, 115: 121-124.
  - Hudson A. T., Randall A. W., Fry M., Ginger C. D., Hill B., Latter V. S., McHardy N., Williams R. B. (1985): Novel anti-malarial hydroxynaphthoquinones with potent broad spectrum anti-protozoal activity. **Parasitology**, 90: 45–55.
  - Hudson J. R. (1950): The recognition of tick-borne fever as a disease of cattle. **Brit. Vet. J.**, 106: 3–17. Citato da Woldehiwet Z., 2009.
  - Hügli D., Moret J., Rais O., Moosmann Y., Erard P., Malinverni R., Gern L. (2009): Tick bites in a Lyme borreliosis highly endemic area in Switzerland. **Int. J. Med. Microbiol.**, 299: 155-60.
  - Humair P. F., Postic D., Wallich R., Gern L. (1998): An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. **Zentralbl. Bakteriol.**, 287: 521-538.
  - Humair P., Gern L. (2000): The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe. **Microbes Infect.**, 2: 915-922.
  - Hume D. A., Himes S. R. (2003): Transcription factors that regulate macrophage development and function. **Handb. Exp. Pharmacol.**, 158: 11-40.
  - Humiczewska M., Kuzna-Grygiel W. (1997): A case of imported human babesiosis in Poland. **Wiad. Parazytol.**, 43: 227–229.
  - Hunfeld K. P., Hildebrandt A., Gray J. S. (2008): Babesiosis: recent insight into an ancient disease. **Int J Parasitol.**, 38(11):1219-1237.
  - Hunter J. S. (1997): Efficacy of Frontline Spray and Frontline Top Spot. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, 19 (10): 15-16.
  - IJdo J. W., Carlson A. C. e Kennedy E. L. (2007): *Anaplasma phagocytophilum* AnkA is tyrosine phosphorylated at EPIYA motifs and recruits SHP-1 during early infection. **Cell. Microbiol.**, 9: 1284–1296.
  - IJdo J. W., Wu C., Telford S. R. 3<sup>rd</sup> e Fikrig E. (2002): Differential expression of the p44 gene



- family in the agent of human granulocytic ehrlichiosis. **Infect Immun.**, 70(9):5295-8.
- IJdo J. W., Zhang Y., Hodzic E., Magnarelli L. A., Wilson M. L., Telford S. R. III (1997): The early humoral response in human granulocytic ehrlichiosis. **J. Infect. Dis.**, 176: 687-692.
  - Iori A., Di Giulio A., De Felici S. (2005): Zecche d'Italia: In: Cringoli G., Iori A., Rinaldi L., Veneziano V., Genchi C. (Eds.) Mappe parassitologiche: Zecche. Rolando Editore, Napoli, 2005, pp. 52-163.
  - Iori A., Gabrielli S., Calderini P., Moretti A., Pietrobelli M., Tampieri M. P., Galuppi R., Cancrini G. (2010): Tick reservoirs for piroplasms in central and northern Italy. **Vet Parasitol.**, 170: 291-296.
  - Irvin A. D. (1987): Characterization of species and strains of *Theileria*. **Adv Parasitol.**, 26: 145-197.
  - Irvin A. D., Orama J. G., Spooner P. R. (1982) : Cycle of bovine lymphoblastoid cells parasitised by *Theileria parva*. **Research in Veterinary Science**, 33 : 298-304.
  - Irvin A. D., Stagg D. A., Kanhai G. K., Brown C. G., Omwoyo P. L. (1975): Studies on cell fusion between *Babesia rodhaini*-infected mouse erythrocytes and baby hamster kidney cells. **Int. J. Parasitol.**, 5: 465-470.
  - Irwin P. J. (2009): Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. **Parasites & Vectors**, 2 (Suppl. I): 1-9.
  - Ismail N., Bloch K. C., McBride J. W. (2010): Human Ehrlichiosis and Anaplasmosis. **Clin. Lab. Med.**, 30(1): 261-292.
  - Iwasaki H., Akashi K. (2007): Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. **Immunity**, 26: 726-740.
  - Jacobsen M., Zhou D., Cepok S., Nessler S., Happel M., Stei S., Wilske B., Sommer N., Hemmer B. (2003): Clonal accumulation of activated CD8+ T cells in the central nervous system during the early phase of neuroborreliosis. **J. Infect. Dis.** 187: 963-973.
  - Jacobson R. H., Chang Y. F., Shin S. J. (1996): Lyme disease: laboratory diagnosis of infected and vaccinated symptomatic dogs. **Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim)**, 11: 172-183.
  - Jahangir A., Kolbert C., Edwards W., Mitchell P., Dumler J. S., Persing D. H.. (1998): Fatal pancarditis associated with human granulocytic ehrlichiosis in a 44-yearold man. **Clin Infect Dis.**, 27: 1424-1427.
  - Jamieson S. (1947): Some aspects of immunity to tick-borne fever in hogs. **Vet. Rec.**, 62: 468-470. Citato da Woldehiwet Z., 2009.
  - Jauron S. D., Nelson C. M., Fingerle V., Ravyn M. D., Goodman J. L., Johnson R. C., Lobentanzer R., Wilske B. e Munderloh U. G. (2001): Host cell-specific expression of a p44 epitope by the human granulocytic ehrlichiosis agent. **J Infect Dis.**, 184(11): 1445-1450.
  - Jeannin P. (1996): How veterinary insecticides for the treatment of dogs and cats are tested. **International Forum on Fleas and Ticks Control**, Rhole-Merieux: 47-51.
  - Jefferies R., Ryan U. M., Irwin P. J. (2007a): PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. **Vet. Parasitol.**, 144: 20-27.
  - Jefferies R., Ryan U. M., Jardine J., Broughton D. K., Robertson I. D., Irwin P. J. (2007b): Blood, bull terriers and babesiosis: further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. **Aust. Vet. J.**, 85: 459-463
  - Jenkins A., Handeland K., Stuen S., Schouls L., van de Pol I., Meen R. T., Kristiansen B. E. (2001): Ehrlichiosis in a moose calf in Norway. **J. Wildl. Dis.**, 37: 201-203.
  - Jensen J., Simon D., Murua Escobar H., Soller J. T., Bullerdiek J., Beelitz P., Pfister K. e Nolte I. (2007): *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. **Zoonoses Public Health.**, 54: 94-101.
  - Jensen K., Makins G. D., Kaliszewska A., Hulme M. J., Paxton E., Glass E. J. (2009): The protozoan parasite *Theileria annulata* alters the differentiation state of the infected macrophage and suppresses musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene (MAF) transcription factors. **International Journal for Parasitology**, 39: 1099-1108.

- Jensen P.M. (2000): Host seeking activity of the *Ixodes ricinus* ticks based on daily consecutive flagging samples. **Experimental and Applied Acarology**, 24: 695-708.
- Jerant A. F., Arline A. D. (1993): Babesiosis in California. **West. J. Med.**, 158: 622–625.
- Jones S. A. L. (2003): Ectoparasitici. In: Aiello S.E., Mays A. (Eds.) Il Manuale Merck Veterinario. C. Giraldi Editore, Bologna, 2003, pp. 1843-1846.
- Jouda F, Perret JL, Gern L. (2004): Density of questing *Ixodes ricinus* nymphs and adults infected by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Switzerland: spatio-temporal pattern at a regional scale. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, 4(1): 23-32.
- Joyner L. P., Donnelly Y. (1979): The epidemiology of Babesial infection. In W.H.R. Lumsden, Muller R., Baker J.R. (ed.) **Advances in parasitology**, vol 17, Academic press London, United Kingdom, pp 115-140.
- Juste R. A., Scott G. R., Paxton E. A., Gelabert J. L. (1989): Presence of *Cytoecetes phagocytophila* in an atypical disease of cattle in Spain. **Vet. Rec.** 124: 636. Citato da Woldehiwet Z., 2010.
- Kaaya G. P. (2000): Laboratory and field evaluation of entomogenous fungi for tick control. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 916: 559–564.
- Kahl O., Janetzki-Mittmann C., Gray J. S., Jonas R., Stein J., deBoer R. (1998): Risk of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato for a host in relation to the duration of nymphal *Ixodes ricinus* feeding and the method of tick removal. **Zentralbl. Bakteriologie**, 287: 41–52. Citato da Bhate C. e Schwartz R. A., 2011.
- Kain K. C., Brown A. E., Lanar D. E., Ballou W. R., Webster H. K. (1993): Response of *Plasmodium vivax* variants to chloroquine as determined by microscopy and quantitative polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 49: 478–484.
- Kaiser R. (1998): Neuroborreliosis. **J. Neurol.**, 245: 247-255.
- Kakoma I., Mehlhorn H. (1993): Babesia of domestic animals. In J. P. Kreier (Ed.), **Parasitic protozoa**, 2nd ed., vol. 7. Academic Press, San Diego, Calif. pp 141– 216.
- Kalantarpour F., Chowdhury I., Wormser G. P., Aguero-Rosenfeld M. E. (2000): Survival of the human granulocytic ehrlichiosis agent under refrigeration conditions. **J Clin Microbiol.**, 38: 2398–2399.
- Kalinova Z., Halanova M., Cislakova L., Sulinova Z., Jarcuska P. (2009): Occurrence of IgG antibodies to *Anaplasma phagocytophilum* in **humans** suspected of Lyme borreliosis in eastern Slovakia. **Ann Agric Environ Med.**, 16: 285-288.
- Kalish R. A., McHugh G., Granquist J., Shea B., Ruthazer R., Steere A. C. (2001): Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10-20 years after active Lyme disease. **Clin. Infect. Dis.**, 33: 780-785.
- Kane A., Block G., Heeb L. A. (2011): An unusual presentation of granulocytic anaplasmosis in a young dog. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, 47(4):276-279.
- Kannian P., Drouin E. E., Glickstein L., Kwok W. W., Nepom G. T., Steere A. C. (2007): Decline in the frequencies of *Borrelia burgdorferi* OspA161 175-specific T cells after antibiotic therapy in HLA-DRB1\* 0401-positive patients with antibiotic-responsive or antibiotic-refractory Lyme arthritis. **J. Immunol.**, 179: 6336-6342.
- Karakashian S. J., Rudzinska M. A., Spielman A., Lewengrub S., Piesman J., Shoukrey N. (1983): Ultrastructural studies on sporogony of *Babesia microti* in salivary gland cells of the tick *Ixodes dammini*. **Cell. Tissue Res.**, 231: 275-287.
- Karlsson M., Hovind-Hougen K., Svenungsson B., Stiernstedt G. (1990): Cultivation and characterization of spirochetes from cerebrospinal fluid of patients with Lyme borreliosis. **J. Clin. Microbiol.**, 28: 473–479.
- Karlsson U., Bjoersdorff A., Massung R. F., Christensson B. (2001): Human granulocytic ehrlichiosis—a case in Scandinavia. **Scand. J. Infect. Dis.**, 33: 805–806.
- Karma A., Seppala I., Mikkila H., Kaakkola S., Viljanen M., Tarkkanen A. (1995): Diagnosis and clinical characteristics of ocular Lyme borreliosis. **Am. J. Ophthalmol.**, 119: 127-135.
- Käsbohrer A., Schönberg A. (1990): Serologic studies of the occurrence of *Borrelia burgdorferi* in domestic animals in Berlin (West). **Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.**, 103: 374-378.

- Citato da Hansen e coll. (2010).
- Kataoka K., Nishizawa M., Kawai S. (1993): Structure-function analysis of the maf oncogene product, a member of the b-Zip family. **J. Virol.**, 67: 2133-2141.
  - Katargina O., Geller J., Alekseev A., Dubinina H., Efremova H., Mishaeva N., Vasilenko V., Kuznetsova T., Järvekülg L., Vene S., Lundkvist A. e Golovljova I. (2011): Identification of *Anaplasma phagocytophilum* in tick populations in Estonia, European Part of Russia and Belarus. **Clin. Microbiol. Infect.** doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03457.x.
  - Katavolos P., Armstrong P. M., Dawson J. E., et al. (1998): Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis. **J. Infect. Dis.**, 177: 1422-1425.
  - Kawabata H., Masuzawa T., Yanagihara Y. (1993): Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from Ixodes ovatus in Japan. **Microbiol. Immunol.**, 37: 843-848.
  - Kawazu S., Kamio T., Kakuda T., Terada Y., Sugimoto C., Fujisaki K. (1999): Phylogenetic relationships of the benign *Theileria* species in cattle and Asian buffalo based on the major piroplasm surface protein (p33/34) gene sequences. **Int J Parasitol.**, 29(4): 613-618.
  - Keck G. (1995): Tossicologia e antidoti dei principali antiparassitari per pulci e zecche. **Supplemento Veterinaria**, 1: 23-30.
  - Keirans J.E., Durden A.D. (2005): Tick Systematics and Identification. In: Goodman J.L., Dennis D.T., Sonenshine D.E.(Eds.) Tick Borne Diseases of Humans. ASM Press, Washington, pp. 123-140.
  - Keller D., Koster F. T., Marks D. H., Hosbach P., Erdile L. F., Mays J. P. (1994): Safety and immunogenicity of a recombinant outer surface protein A Lyme vaccine. **J. Am. Med. Assoc.**, 271: 1764-1768.
  - Kelly R. (1971): Cultivation of *Borrelia hermsii*. **Science**, 173: 443-444.
  - Kemp D. H., McKenna R. V., Thullner R., Willadsen, P. (1999). Strategies for tick control in a world of acaricide resistance. In *Control de la Resistencia en Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria y Enfermedades que Transmiten*, IV Seminario Internacional de Parasitología Animal, eds. Morales, G., Fragosa, H. & Garcia, Z., Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico, pp. 1-10.
  - Khanakah G., Kocianová E., Výrosteková V., Rehacek J., Kundi M., Stanek G. (2006): Seasonal variations in detecting *Borrelia burgdorferi* sensu lato in rodents from north eastern Austria. **Wien Klin. Wochenschr.**, 118: 754-758.
  - Killilea M. E., Swei A., Lane R. S., Briggs C. J., Ostfeld R. S.(2008): Spatial dynamics of lyme disease: a review. **Ecohealth**, 5: 167-195.
  - Kim C. M., Yi Y. H., Yu D. H., Lee M. J., Cho M. R., Desai A. R., Shringi S., Klein T. A., Kim H. C., Song J. W., Baek L. J., Chong S. .T, O'guinn M. L., Lee J. S., Lee I. Y., Park J. H., Foley J., Chae J. S. (2006): Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. *Appl Environ Microbiol.*, 72(9): 5766-5776.
  - Kim H. Y., Mott J., Zhi N., Tajima T. e Y. Rikihisa. (2002): Cytokine gene expression by peripheral blood leukocytes in horses experimentally infected with *Anaplasma phagocytophila*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, 9: 1079-1084.
  - Kimura M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol.**, 16: 111-120.
  - Kiss T., Cadar D., Krupaci A. F., Bordeanu A., Brudașcă G. F., Mihalca A. D., Mircean V., Gliga L., Dumitrache M. O., Spînu M. (2011): Serological reactivity to *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs and horses from distinct areas in Romania. **Vector Borne Zoonotic. Dis.**, 11(9): 1259-1262.
  - Kjemtrup A. M., Conrad P. A. (2000): Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *Intern. J. Parasit.*, 30(12-13):1323-1337.
  - Kjemtrup A. M., Thomford T. J., Gardner I. A., Conrad P. A. (1995): Seroprevalence of two *Babesia* spp. isolates in selected bighorn sheep (*Ovis canadensis*) and mule deer (*Odocoileus hemionus*) populations in California **J. Wild. Dis.**, 31: 467-471.
  - Kjemtrup A.M., Wainwright K., Miller M., Penzhorn B.L., Carreno R.A. (2006): *Babesia conradae*, sp. nov.a small canine *Babesia* identified in California. **Vet. Parasitol.**, 138: 103-

- 111.
- Kleespies R. (1993): Untersuchungen zur Biologie und Anwendung des entomopathogenen Pilzes *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin zur biologischen Bekämpfung afrikanischer Wanderheuschrecken. Thesis, TH Darmstadt, Germany, pp. 348.
- Klein M. B., Miller J. S., Nelson C. M., Goodman J. L. (1997a): Primary bone marrow progenitors of both granulocytic and monocytic lineages are susceptible to infection with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. **J. Infect. Dis.**, 176: 1405–1409.
- Klein M. B., Nelson C. M., Goodman J. L. (1997b): Antibiotic susceptibility of the newly cultivated agent of human granulocytic ehrlichiosis: promising activity of quinolones and rifamycins. **Antimicrob Agents Chemother.**, 41: 76–79.
- Knowles D. P. (1996): Control of *Babesia equi* parasitemia. **Parasitol. Today**, 12: 195–198.
- Knowles D. P., Torioni de Echaide S., Palmer G. H., McGuire T., Stiller D., McElwain T. F. (1996): Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 2225–2230.
- Knuth P., duToit P. J. (1992): Die piroplasmoses des Schweines: Die durch *Piroplasma trautmanni* (nov. Spec.) verursachte Piroplasmose. In: Handbuch der tropenkrankheiten, Vol. 6, Leipzig, Germany.
- Koch R. (1906). Kultivierungsversuch der Hunde piroplasmen. **Z. Hyg. Infektionskr.**, 54: 1–9. Citato da Ristic M., 1988.
- Kohn B., Galke D., Beelitz P., Pfister K. (2008): Clinical features of canine granulocytic ehrlichiosis in 18 naturally infected dogs. **J Vet Intern Med.**, 22:1289–1295.
- Korbutiak E., Schneiders D. H. (1994): First confirmed case of equine ehrlichiosis in Great Britain. **Equine Vet. Educ.**, 6: 303–304.
- Kornblatt A. N., Urband P. H., Steere A. C. (1985): Arthritis caused by *Borrelia burgdorferi* in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 186, 960–964.
- Kramer L., Mancianti F., Otranto D. (2010): Parassiti del cane e del gatto. In Taylor M. A., Coop R. L., Wall R. L. (Eds.), **Parassitologia e malattie parassitarie degli animali**, EMSI, Roma, Italia, pp: 358–464.
- Kramer V. L., Beesley C. (1993): Temporal and spatial distribution of *Ixodes pacificus* and *Dermacentor occidentalis* (Acari: Ixodidae) and prevalence of *Borrelia burgdorferi* in Contra Costa county, California. **J. Med. Entomol.**, 30: 549–554.
- Krause P. J., Gewurz B. E., Hill D., Marty F. M., Vannier E., Foppa I. M., Furman R. R., Neuhaus E., Skowron G., Gupta S., McCalla C., Pesanti E. L., Young M., Heiman D., Hsue G., Gelfand J. A., Wormser G. P., Dickason J., Bia F. J., Hartman B., Telford S. R. 3rd, Christianson D., Dardick K., Coleman M., Giroto J. E., Spielman A. (2008): Persistent and relapsing babesiosis in immunocompromised patients. **Clin. Infect. Dis.**, 3: 370–376.
- Krause P. J., Lepore T., Sikand V. K., Gadbaw J. Jr, Burke G., Telford S.R. 3rd, Brassard P., Pearl D., Azlanzadeh J., Christianson D., McGrath D., Spielman A (2000): Atovaquone and azithromycin for the treatment of babesiosis. **T. N. Engl. J. of Med.**, 343: 1454–1458.
- Krause P. J., McKay K., Thompson C. A., Sikand V. K., Lentz R., Lepore T., Closter L., Christianson D., Telford S. R., Persing D., Radolf J. D., Spielman A.; Deer-Associated Infection Study Group. (2002): Disease-specific diagnosis of coinfecting tickborne zoonoses: babesiosis, human granulocytic ehrlichiosis, and Lyme disease. **Clin. Infect. Dis.**, 34: 1184–1191.
- Krause P. J., Spielman A., Telford S. R. III, Sikand V. K., McKay K., Christianson D., Pollack R. J., Brassard P., Magera J., Ryan R., Persing D. H. (1998): Persistent parasitemia after acute babesiosis. **N. Engl. J. Med.**, 339: 160–165.
- Krause P. J., Telford S. R. III, Ryan R. (1991): Geographical and temporal distribution of babesial infection in Connecticut. **J. Clin. Microbiol.**, 29: 1–4.
- Krause P. J., Telford S. R. III, Ryan R., Conrad P. A., Wilson M., Thomford J. W., Spielman A. (1994): Diagnosis of babesiosis: evaluation of a serologic test for the detection of *Babesia microti* antibody. **J. Infect. Dis.**, 169: 923–926.
- Krause P. J., Telford S. R. III, Spielman A., Ryan R., Magera J., Rajan T. V., Christianson D.,

- Alberghini T. V., Bow L., Persing D. (1996a): Comparison of PCR with blood smear and inoculation of small animals for diagnosis of *Babesia microti* parasitemia. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 2791-2794.
- Krause P. J., Telford S. R. III, Spielman A., Sikand V., Ryan R., Christianson D., Burke G., Brassard P., Pollack R., Peck J., Persing D. H. (1996b): Concurrent Lyme disease and babesiosis: evidence for increased severity and duration of illness. **JAMA**, 275: 1657–1660.
  - Kristiansen BE, Jenkins A, Tveten Y, Karsten B, Line Ø, Bjöersdorff A. 2001): **Human granulocytic ehrlichiosis in Norway. Tidsskr. No.r Laegeforen.**, 121(7):805-806. Citato da Woldehiwet Z., 2010.
  - Kubiak K., Dziekonska-Rynko J. (2006): Seasonal activity of the common European tick, *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758), in the forested areas of the city of Olsztyn and its surroundings. **Wiadomosci Parazytologiczne**, 52 (1): 59-64.
  - Kumar S., Jaykumar K., Sriniragan M.R., Ramesh N., Hohnegowda C., Narayana K., Udupa V. (2001): Biological efficacy of amitraz against the three host tick *Rhipicephalus sanguineus*. **International Journal of Animal Science**, 71 (6): 527-528.
  - Kumar S., Jaykumar K., Sriniragan M.R., Ramesh N., Hohnegowda C., Narayana K., Udupa V. (2001): Biological efficacy of amitraz against the three host tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Int. J. Anim. Sci.**, 71 (6): 527-528.
  - Kumi-Diaka J., Harris O. (1995): Viability of *Borrelia burgdorferi* in stored semen. **Br. Vet. J.**, 151: 221-224.
  - Kunz S. E., Kemp D. H. (1994). Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Revue scientifique et technique de l'Office International des Epizooties*, 13: 1249–1286.
  - Kurtenbach K., Peacey M., Rijpkema S. G., Hoodless A. N., Nuttall P. A., Randolph S. E. (1998): Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. **Appl. Environ. Microbiol.**, 64: 1169-1174.
  - Kurtti T. J., Munderloh U. G., Ahlstrand G. G., Johnson R. C. (1988): *Borrelia burgdorferi* in tick cell culture: growth and cellular adherence. **J. Med. Entomol.** 25: 256–261.
  - Kurtti T. J., Munderloh U. G., Johnson R. C., Ahlstrand G. G. (1987): Colony formation and morphology in *Borrelia burgdorferi*. **J. Clin. Microbiol.**, 25:2054-2058.
  - Kuźna-Grygiel W., Bukowska K., Cichocka A., Kosik-Bogacka D., Skotarczak B. (2002): The prevalence of piroplasms in a population of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) from north-western Poland. **Ann Agric Environ Med.**, 9(2): 175-178.
  - Labuda M., Nuttall P. (2008): Viruses transmitted by ticks. In: Ticks: Biology, Disease and Control, Cambridge University Press Ed.
  - Labuda M., Trimnell A.R., Ličková M., Kazimírová M., Davies G.M., Lissina O., Hails R.S., Nuttall P.A. (2006): An antivector vaccine protects against a lethal vector-borne pathogen. **Public Library of Science Pathogens**, 2: e27.
  - Laferl H, Hogrefe W, Kock T, Pichler H. (1999): A further case of acute human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, 18: 385–386.
  - Lane R. S. (1990): Seasonal activity of two human-biting ticks. **California Agriculture**, 44: 23-25.
  - Lane R. S. (1994): Ticks of California and their public health significance. **J Spirochetal Tick-Borne Dis.**, 1: 74-76.
  - Lane R. S., Mun J., Eisen L., Eisen R. J. (2006): Refractoriness of the western fence lizard (*Sceloporus occidentalis*) to the Lyme disease group spirochete *Borrelia bissetii*. **J. Parasitol.**, 92: 691-696.
  - Lane R. S., Piesman J., Burgdorfer W. (1991) . Lyme borreliosis: relation of its causative agent to its vectors and hosts in North America and Europe. **Annu. Rev. Entomol.**, 36: 587–609.
  - Lane R. S., Quistad G. B.. (1998): Borreliacidal factor in the blood of the western fence lizard (*Sceloporus occidentalis*). **J. Parasitol.**, 84: 29-34.
  - Lange R., Seyyedi S. (2002): Evidence of a Lyme borreliosis infection from the viewpoint of laboratory medicine. **Int. J. Med. Microbiol.**, 291(suppl 33): 120-124.

## Bibliografia

- Langton C., Gray J. S., Waters P. F., Holman P. J. (2003) Naturally acquired babesiosis in a reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) herd in Great Britain. **Parasitol. Res.**, 89, 194–198.
- Lappin M. R., Breitschwerdt E. B., Jensen W. A., Dunnigan B., Rha J. Y., Williams C. R., Brewer M., Fall M. (2004): Molecular and serologic evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats in North America. **J Am Vet Med Assoc.**, 225: 893-896.
- Lasota J. A., Dybas R. A. (1991). Avermectins, a novel class of compounds: implications for use in arthropod pest control. **Ann. Rev. Entomol.**, 36: 91–117.
- Latif A. A., Walker A. R. (2004): An introduction to the biology and control of ticks in Africa. ICTTD-2, (Ed.).
- Laveran A. (1901): Contribution a l'etude du Piroplasma equi. **C.R. Soc. Biol.**, 53, p 385 (citato da Ristic, 1988).
- Lawrence D. A., Shone D. K. (1955): Porcine Piroplasmosis. *Babesia trautmanni* infection in Southern Rhodesia. **J. S. Afr. Vet. Med. Ass.**, 26: 89-93.
- Le Fleche A., Postic D., Girardet K., Peter O., Baranton G. (1997): Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 47: 921-925.
- Lebech A. M., Hansen K., Pancholi P., Sloan L. M., Magera J. M., Persing D. H. (1998): Immunoserologic evidence of human granulocytic ehrlichiosis in Danish patients with Lyme neuroborreliosis. **Scand. J. Infect. Dis.**, 30: 173–176.
- Lebet N., Gern L. (1994). Histological examination of *Borrelia burgdorferi* infection in unfed *Ixodes ricinus* nymphs. **Exp. App. Acarol.**, 18: 177–183.
- Lee H. C., Kioi M., Han J., Puri R. K., Goodman J. L. (2008): *Anaplasma phagocytophilum* induced gene expression in both human neutrophils and HL-60 cells. **Genomics**, 92: 144–151.
- Leeflang P., Perie N. M. (1972): Comparative immunofluorescent studies on 4 *Babesia* species of cattle. **Res. Vet. Sci.**, 13: 342-346.
- Lehtinen L. E., Birkenheuer A. J., Drolesky R. E., Holman P. J. (2008): In vitro cultivation of a newly recognised *Babesia* sp. in dogs in North Carolina. **Vet. Parasitol.**, 151: 150-157.
- Lempereur L., De Cat A., Caron Y., Madder M., Claerebout E., Saegerman C., Losson B. (2011): First molecular evidence of potentially zoonotic *Babesia microti* and *Babesia* sp. EU1 in *Ixodes ricinus* ticks in Belgium. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, 11(2): 25-30.
- Lencakova D., Fingerle V., Stefancikova A., Schulte-Spechtel U., Petko B., Schreter I., et al. (2008): Evaluation of recombinant line immunoblot for detection of Lyme disease in Slovakia: comparison with two other immunoassays. **Vector Borne Zoon. Dis.**, 8: 381-390.
- Lennhoff C. (1948): Spirochetes in aetiologically obscure diseases. **Acta Derm. Venereo.**, 28: 295-324. Citato da Bhate C., Schwartz R. A., 2011.
- Leonovich S. A. (2004): Phenol and lactone receptors in the distal sensilla of the Haller's organ in *Ixodes ricinus* ticks and their possible role in host perception. **Exp.App. Acarol.**, 32: 89–102.
- Lepidi H., Bunnell J. E., Martin M. E., Madigan J. E., Stuen S., Dumler J. S. (2000): Comparative pathology and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections. **Am J Trop Med Hyg.**, 62: 29–37.
- Leuba-Garcia S, Kramer MD, Wallich R, Gern L. (1994): Characterization of *Borrelia burgdorferi* isolated from different organs of *Ixodes ricinus* ticks collected in nature. **Zentralbl Bakteriol.**, 280: 468-475.
- Levi O., Waner T., Baneth G., Keysary A., Bruchim Y., Silverman J., Harrus S.(2006): Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* among healthy dogs and horses in Israel. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.**, 53: 78–80.
- Levin M. L., Fish D. (2001): Interference between the agents of Lyme disease and human granulocytic ehrlichiosis in a natural reservoir host. **Vector-borne Zoonotic Dis.**, 1:0139-148.
- Levine N. D. (1971): Taxonomy of the piroplasms. **Trans. Am. Microsc. Soc.**, 90: 2-33.
- Levine N. D. (2000): The protozoan phylum apicomplexa – vol II – CRC Press inc Boca Raton, Florida pp 42-44.

- Levy S. A., Dombach D. M., Barthold S. W., et al. (1993): Canine Lyme Borreliosis. **Compend. Cont. Educ. Pract. Vet. Small. Anim.**, 15: 833-846.
- Levy S. A., Magnarelli L. A. (1992): Relationship between development of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and the subsequent development of limb/joint borreliosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 200: 344-347.
- Levy S. A., O'Connor T. P., Hanscom J. L., Shields P. (2003): Evaluation of a canine C6 ELISA Lyme disease test for the determination of the infection status of cats naturally exposed to *Borrelia burgdorferi*. **Vet Ther.**, 4: 172-177.
- Lewengrub S., Rudzinska M. A., Piesman J., Spielman A., Gubert E. (1988): Hyperthermia and sporogony of *Babesia microti* in the tick *Ixodes dammini*: an ultrastructural study. **Can. J. Zool.**, 66: 1342-1351. Citato da Hodgson J. L. e coll., 1992.
- Lewis D., Purnell R. E., Francis L. M. A., Young E. R. (1981): The effect of treatment with imidocarb dipropionate on the course of *Babesia divergens* infections in splenectomised calves, and their subsequent immunity to homologous challenge. **J. Comp. Pathol.**, 91: 285-292.
- L'Hostis M., Seegers H. (2002): Tick-borne parasitic diseases in cattle: current knowledge and prospective risk analysis related to the ongoing evolution in French cattle farming systems. **Vet Res.**, 33(5): 599-611.
- Li P. N. (1957): Studium des Stoffwechsels beim Schafen mit Babesiose. **Trudy Vsesoyznogo Instituta Eksperimentalnoi Meditsiny**, 21: 260-265.
- Li X., Dunley J. E. (1998): Optimal sampling and spatial distribution of *Ixodes pacificus*, *Dermacentor occidentalis* and *Dermacentor variabilis* ticks (Acari: Ixodidae). **Experimental Applied Acarology**, 22: 233-248.
- Liang F. T., Jacobson R. H., Straubinger R. K., Grooters A., Philipp M. T. (2000): Characterization of a *Borrelia burgdorferi* VlsE invariable region useful in canine Lyme disease serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.** 38: 4160-4166.
- Lignieres (1903): La piroplasmose bovine. Nouvelles recherches et préservations sur la multiplicité des parasites, leur évolution, la transmission naturelle de la maladie et vaccination. **Arch. Parasite.**, 7: 398-407.
- Lignieres (1910): La prophylaxe et la pathologie des maladies protozoaires (piroplasmoses, trypanosomoses, etc.) avec démonstration des parasites spécifiques et des animaux transmetteurs (tiques, mustiques, etc.). **Tr. 9 Int. Vet. Congr. (The Hague, 1909)**, 1: 1-18.
- Lilliehook I., Egenvall A., Tvedten H. W. (1998): Hematopathology in dogs experimentally infected with a Swedish granulocytic Ehrlichia species. **Vet Clin Pathol.**, 27: 116-122.
- Lilliehöök I., Johannisson A., Magnusson U., Egenvall A., Trowald-Wigh G., Håkansson L. (1999): Granulocyte function in dogs experimentally infected with a Swedish granulocytic Ehrlichia species. **Vet Immunol Immunopathol.**, 67: 141-152.
- Lin M., den Dulk-Ras A., Hooykaas P. J. (2007): *Anaplasma phagocytophilum* AnkA secreted by type IV secretion system is tyrosine phosphorylated by Abl-1 to facilitate infection. **Cell Microbiol.**, 9: 2644-2657.
- Lin M., Rikihisa Y. (2003): *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. **Infect. Immun.**, 71: 5324-5331.
- Lin M., Rikihisa Y. (2004): Bacteria-specific tyrosinephosphorylated proteins in *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum*-infected host cells. In *ASM 104<sup>th</sup> General Meeting*. ASM General Meeting Committee (ed.). New Orleans, LA: American Society for Microbiology, p. 127.
- Lin T., Oliver J. H. Jr, Gao L. (2004): Molecular characterization of *Borrelia* isolates from ticks and mammals from the southern United States. **J Parasitol.**, 90(6): 1298-1307.
- Lin T., Oliver J. H. Jr, Gao L., Kollars T. M. Jr, Clark K. L. (2001): Genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the southern United States based on restriction fragment length polymorphism and sequence analysis. **J. Clin. Microbiol.**, 39: 2500-2507.
- Lindgren E., Jaenson T. G. T. (2006): Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and

- climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. Copenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe.
- Lindgren E., Talleklint L., Polfeldt T. (2000): Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. **Environ. Health. Perspect.**, 108:119-23.
  - Lipschütz B. (1913): Über eine seltene Erythemform (erythema chronicum migrans). **Arch. Dermatol. Syph.**, 118: 349-356. Citato da Bhate C., Schwartz R. A., 2011.
  - Lissman B. A., Bosler E. M., Camay H., Ormiston B. G., Benach J. L. (1984): Spirochete-associated arthritis (Lyme disease) in a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 185: 219-220.
  - Little S. E., Heise S. R., Blagburn B. L., Callister S. M., Mead P. S. (2010): **Lyme** borreliosis in dogs and humans in the USA. **Trends Parasitol.**, 26(4): 213-218.
  - Littlejohn A. I. (1950): Tick-borne fever as a cause of abortion in sheep. **Vet. Rec.**, 62: 577–579.
  - Liu H., Shi B., Huang C. C., Eksarko P., Pope R. M. (2008): Transcriptional diversity during monocyte to macrophage differentiation. **Immunol. Lett.**, 117: 70-80.
  - Liu L., Narasimhan S., Dai J., Zhang L., Cheng G. e Fikrig E. (2011): *Ixodes scapularis* salivary gland protein P11 facilitates migration of *Anaplasma phagocytophilum* from the tick gut to salivary glands. **EMBO Rep.**, 12: 1196-1203.
  - Liz J. S., Anderes L., Sumner J. W., Massung R. F., Gern L., Rutti B. e Brossard M., (2000): PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. **J. Clin. Microbiol.**, 38: 1002–1007.
  - Liz J. S., Sumner J. W., Pfister K., Brossard M. (2002): PCR detection and serological evidence of granulocytic ehrlichial infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*). **J. Clin. Microbiol.**, 40: 892–897.
  - Ljostad U., Okstad S., Topstad T., Mygland A., Monstad P. (2005): Acute peripheral facial palsy in adults. **J. Neurol.**, 252: 672-676.
  - Lo R., Menzies D. J., Archer H., Cohen T. J. (2003): Complete heart block due to lyme carditis. **J. Invasive Cardiol.**, 15: 367-369.
  - Logar M., Ruzic-Sabljic E., Maraspin V., Lotric-Furlan S., Cimperman J., Jurca T., Strle F. (2004): Comparison of erythema migrans caused by *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*. **Infection**, 32: 15-19.
  - Lohr K. F. (1969): Immunisierung gegen Babesiose und Anaplasmosen von 40 nach Kenya importierten Charollais-Rindern und Bericht über Erscheinungen der Photosensibilität bei diesen Tieren. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, 16: 40-46.
  - Loi S. (2001): Bioecologia di *Rhipicephalus sanguineus* in Sardegna, parametri favorevoli la diffusione e il controllo. Tesi di dottorato in Epizootologia, Epidemiologia e Chemioterapia delle Malattie Parassitarie, XIV- Ciclo, Università degli studi di Cagliari.
  - Lopez-Jimenez L. (1997): Babesiosis in a splenectomised patient. Is it the first case in Spain? **Med. Clin. (Barcelona)**, 108: 717.
  - Lotric-Furlan S., Petrovec M., Zupanc T. A., Nicholson W. L., Sumner J. W., Childs J. E., Strle F. (1998): Human granulocytic ehrlichiosis in Europe: clinical and laboratory findings for four patients from Slovenia. **Clin. Infect. Dis.**, 27: 424–428.
  - Luft B. J., Dattwyler R. J., Johnson R. C., Luger S. W., Bosler E. M., Rahn D. W., Masters E. J., Grunwaldt E., Gadgil S. D. (1996): Azithromycin compared with amoxicillin in the treatment of erythema migrans. A double-blind, randomized, controlled trial. **Ann. Intern. Med.**, 124: 785-791.
  - Lykins J. D., Ristic M., Weisiger R. M. (1975): *Babesia microti*: pathogenesis of parasite of human origin in the hamster. **Exp. Parasitol.**, 37: 388–397.
  - M'Fadyean J., Stockman S. (1911): A new species of piroplasm found in the blood of British cattle. **J. Comp. Pathol.**, 24: 340-354.
  - M'ghirbi Y., Ghorbel A., Amouri M., Nebaoui A., Haddad S. e Bouattour A. (2009): Clinical, serological and molecular evidence of ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs in Tunisia. **Parasitol Res.**, 104: 767–774.



## Bibliografia

- MacDonald A. B., Benach J. L., Burgdorfer W. (1987): Stillbirth following maternal Lyme disease. **N. Y. State. J. Med.**, 87: 615-616.
- Machtinger, L., Telford S. R. III, Inducil C., Klapper E., Pepkowitz S. H., Goldfinger D. (1993): Treatment of babesiosis by red blood cell exchange in an HIV-positive, splenectomized patient. **J. Clin. Apheresis** 8: 78-81.
- Macicka O. (1958): Sulla biologia di *Haemaphysalis inermis*. **Csika. Parsit.**, 5: 121-124.
- MacLeod J. (1932): Preliminary studies in tick transmission of louping ill. II. A study of the reaction of sheep to tick infestation. **Vet. J.**, 88: 276-284.
- MacLeod J. (1936): Studies on tick-borne fever of sheep. II. Experiment on transmission and distribution of the disease. **Parasitology**, 28: 320-329.
- MacLeod J. (1962): Ticks and disease in domestic stock in Great Britain. **Symp. Zool. Soc. Lond.**, 6: 29-50.
- MacLeod J., Gordon W. S. (1933): Studies on tick-borne fever of sheep. I. Transmission by the tick *Ixodes ricinus* with a description of the disease produced. **Parasitology**, 25: 273-283.
- Madewell B. R. and Gribble D. H. (1982). Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*. **J. Am. Vet. Assoc.**, 180: 512-514.
- Madigan J. (1993): Equine ehrlichiosis. In: Woldehiwet, Z., Ristic, M. (Eds.), Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals. Pergamon Press, Oxford, pp. 209-214.
- Madigan J. E., Barlough J. E., Dumler J. S., Schankman N. S., DeRock E. (1996): Equine granulocytic ehrlichiosis in Connecticut caused by an agent resembling the human granulocytotropic ehrlichia. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 434-435.
- Madigan J. E., Gribble D. (1987): Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968-1981). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 190: 445-448.
- Madigan, J. E., Richter P. J. Jr, Kimsey R. B., Barlough J. E., Bakken J. S., Dumler J. S. (1995): Transmission and passage in horses of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. **J. Infect. Dis.** 172: 1141-1144.
- Magnarelli L. A. (1988): Serologic diagnosis of Lyme disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 539: 154-61.
- Magnarelli L. A., (2011): The role of vertebrate hosts in tick-borne infections. **Clin. Microb. Newsl.** 33: 17-20.
- Magnarelli L. A., Anderson J. F., Schreier A. B., Ficke C. M. (1987): Clinical and serologic studies of canine borreliosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 191: 1089-1094.
- Magnarelli L. A., Anderson J. F., Shaw E, Post J. E., Palka F. C. (1988): Borreliosis in equids in northeastern United States. **Am. J. Vet. Res.**, 49: 359-362.
- Magnarelli L. A., Bushmich S. L., Ijdo J. W., Fikrig E. (2005): Seroprevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in cats. **Am J Vet Res.** 66(11): 1895-1899.
- Magnarelli L. A., Dumler J.S., Anderson J. F. (1995): Coexistence of antibodies to tick-borne pathogens of babesiosis, ehrlichiosis, and Lyme borreliosis in human sera. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 3054-3057.
- Magnarelli L. A., Ijdo J. W., Anderson J. F., Padula S. J., Flavell R. A., Fikrig E. (1998): Human exposure to a granulocytic *Ehrlichia* and other tickborne agents in Connecticut. **J. Clin. Microbiol.**, 36: 2823-2827.
- Magnarelli L. A., Ijdo J. W., Padula S. J., Flavell R. A., Fikrig E. (2000a): Serologic diagnosis of Lyme borreliosis by using enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens. **J. Clin. Microbiol.**, 38: 1735-1739.
- Magnarelli L. A., Ijdo J. W., Van Andel A. E., Wu C., Padula S. J., Fikrig E. (2000b): Serologic confirmation of *Ehrlichia equi* and *Borrelia burgdorferi* infections in horses from the northeastern United States, **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 217(7): 1045-1050.
- Magnarelli L. A., Levy S. A., Ijdo J. W., Wu C., Padula S. J., Fikrig E. (2001): Reactivity of dog sera to whole-cell or recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* by ELISA and immunoblot analysis. **J Med Microbiol.**, 50: 889-895.
- Magnarelli L. A., Oliver J. H. Jr, Hutcheson H. J., Anderson J. F. (1991): Antibodies to *Borrelia*

- burgdorferi in deer and raccoons. **J. Wildl. Dis.**, 27: 562-568.
- Mahoney D. F. (1977): Babesia of domestic animals, pp 1–52. In J. P. Kreier (ed.), **Parasitic protozoa**, vol. 4. Academic Press, San Francisco, California.
  - Mahoney D. F., Wright I. G., Mirre G. B. (1973): Bovine babesiosis: The persistence of immunity to *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infection. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 67: 197-203.
  - Maioli G., Spaggiari B., Bonilauri P., Calzolari M., DeFilippo F., Luppi A., Dottori M. (2009): Zecche: etologia e malattie trasmesse. **L'osservatorio**, 12 (4): 5-7.
  - Mandel N. S., Senker E. G., Bosler E. M., et al. (1993): Intrathecal production of *Borrelia burgdorferi* specific antibodies in a dog with central nervous system Lyme borreliosis. **Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.**, 15: 581-585.
  - Manfredi M. T., Dini V., Piacenza S., Genchi C. (1999): Tick species parasitizing people in a area endemic for tick-borne diseases in North-Western Italy. **Parassitologia**, 41: 555-560.
  - Mangold A. J., Aguirre D. H., Cafrune M. M., de Echaide S. T., Guglielmone A. A. (1993): Evaluation of the infectivity of a vaccinal and a pathogenic *Babesia bovis* strain from Argentina to *Boophilus microplus*. **Vet. Parasitol.** 51(1-2): 143-148.
  - Maniania N. K., Nchu F., Ekesi S. (2007): Fungal pathogen for biocontrol of ticks. In: Ekesi S. and Maniania N. K. (Eds.) **Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management**. Research Signpost, Kerala, India, pp. 295–392.
  - Manilla G. (1988): Etologia delle zecche e classificazione delle specie endofile. **Rivista di Parassitologia**, 49: 129-136.
  - Manilla G. (1998): Fauna d'Italia. Acari.: Ixodida. Ed calderini, Bologna.
  - Mantelli B., Pecchioli E., Hauffe H. C., Rosà R., Rizzoli A. (2006): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Anaplasma phagocytophilum* in the wood tick *Ixodes ricinus* in the Province of Trento, Italy. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 25: 737-739.
  - Maranga R. O., Hassanali A., Kaaya G. P., Mueke J. M. (2006): Performance of a prototype baited trap in attracting and infecting the tick *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) in field experiments. **Exp. App. Acarol.**, 38: 211–218.
  - Marangoni A., Moroni A., Accardo S., Cevenini R. (2008): *Borrelia burgdorferi* VlsE antigen for the serological diagnosis of Lyme borreliosis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 27: 349-354.
  - Maraspin V., Cimperman J., Lotric-Furlan S., Ruzic-Sabljic E., Jurca T., Picken R. N., Strle F. (2002): Solitary borrelial lymphocytoma in adult patients. **Wien. Klin. Wochenschrift**. 114: 515–523. Citato da Aguero-Rosenfeld e coll., 2005.
  - Maraspin V., Ruzic-Sabljic E., Strle F. (2006): Lyme borreliosis and *Borrelia spielmanii*. **Emerg. Infect. Dis.**, 12: 1177.
  - Marconi R. T., Liveris D., Schwartz I. (1995): Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 2427-2434.
  - Margos G., Hojgaard A., Lane R. S., Cornet M., Fingerle V., Rudenko N., Ogden N., Aanensen D.M., Fish D., Piesman J. (2010): Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissetii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. **Ticks Tick Borne Dis.**, 1: 151–158.
  - Margos G., Vollmer S.A., Kornet M., Garnier M., Fingerle V., Wilske B., Bormane A., Vitorino L., Collares-Pereira M., Drancourt M., Kurtenbach K. (2009): A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. **Appl. Environ. Microbiol.**, 75: 5410–5416.
  - Maroli M., Khoury C., Frustery L., Manilla G. (1996): Diffusione della zecca del cane (*Rhipicephalus sanguineus* Laitreille, 1806) in Italia: un problema di salute pubblica. **Annali Istituto Superiore della Sanità**, 32 (3): 387-397.
  - Martin M. E., Caspersen K., Dumler J. S. (2001): Immunopathology and ehrlichial propagation

- are regulated by interferon-gamma and interleukin-10 in a murine model of human granulocytic ehrlichiosis. **Am J Pathol.**, 158: 1881–1888.
- Martin P., Bigaignon G., Gillion P., Thirion A., Fain A. (1990): Fréquence de *Borrelia burgdorferi* (maladie de Lyme) et répartition de son vecteur *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) dans le district Mosan de Belgique. **Bull. Soc. Fr. Parasitol.**, 8: 331-338.
  - Martinez F. O., Gordon S., Locati M., Mantovani A. (2006): Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. **J. Immunol.**, 177: 7303-7311.
  - Massung R. F., Courtney J. W., Hiratzka S. L., Pitzer V. E., Smith G., Dryden R. L. (2005): *Anaplasma phagocytophilum* in white-tailed deer. **Emerg. Infect. Dis.**, 10: 1604–1606.
  - Massung R. F., Lee K., Mauel M., Gusa A. (2002a): Characterization of the rRNA genes of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophila*. **DNA Cell Biol.**, 21: 587-596.
  - Massung R. F., Levin M. L., Munderloh U. G., Silverman D. J., Lynch M. J., Gaywee J. K., Kurtti T.J., (2007): Isolation and propagation of the Ap-Variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum* in a tick cell line. **J. Clin. Microbiol.** 45, 2138–2143.
  - Massung R. F., Mather T. N., Levin M. L. (2006): Reservoir competency of goats for the Ap-variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum*. **Infect. Immun.**, 74: 1373–1375.
  - Massung R. F., Mauel M. J., Owens J. H., Allan N., Courtney J. W., Stafford 3rd K. C., Mather T.N. (2002b): Genetic variants of *Ehrlichia phagocytophila*, Rhode Island and Connecticut. **Emerg. Infect. Dis.**, 8: 467–472.
  - Massung R. F., Priestley R. A., Miller N. J., Mather T. N., Levin M. L. (2003): Inability of a variant strain of *Anaplasma phagocytophilum* to infect mice. **J. Infect. Dis.**, 188: 1757–1763.
  - Massung R. F., Slater K. G.. (2003): Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. **J Clin Microbiol.** 41: 717-22.
  - Masuzawa T. (2004): Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in East Asia. **J. Infect. Dis.**, 57: 229-235.
  - Masuzawa T., Kharitonov I. G., Okamoto Y., Fukui T., Ohashi N. (2008): Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and its coinfection with *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks inhabiting Tver Province (Russia) - a sympatric region for both tick species. **J. Med. Microbiol.** 57: 986-991.
  - Masuzawa T., Takada N., Kudeken M., Fukui T., Yano Y., Ishiguro F., Kawamura Y., Imai Y, Ezaki T. (2001): *Borrelia sinica* sp. nov., a lyme disease-related **Borrelia** species isolated in China. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 51: 1817-1824.
  - Masuzawa T., Wilske B., Komikado T., Suzuki H., Kawabata H., Sato N., Muramatsu K., Sato N., Isogai E., Isogai H., Johnson R. C., Yanagihara Y. (1996): Comparison of OspA serotypes for *Borrelia burgdorferi* sensu lato from Japan, Europe and North America. **Microbiol. Immunol.**, 40: 539-545.
  - Mather T., Ginsberg H. (1994): Vector-host-pathogens relationship: transmission dynamics of tick-born infection. In: Sonenshine D.E., Mather T. (Eds.) Ecological dynamics of tick-borne zoonoses. Oxford University Press, Oxford, UK, 1994, pp. 107-118.
  - Mathewson H. O., Anderson A. E., Hazard G. W. (1984): Self-limited babesiosis in a splenectomized child. **Pediatric Infectious Disease**, 2: 148–149.
  - Matjila P. T., Penzhorn B. L., Bekker C. P., Nijhof A. M., Jongejan F. (2004): Confirmation of occurrence of *Babesia canis vogeli* in domestic dogs in South Africa. **Vet. Parasitol.**, 122: 119–125.
  - Matsubara J., Koura M., Kamiyama T. (1993): Infection of immunodeficient mice with a mouse-adapted substrain of the gray strain of *Babesia microti*, **J. Parasitol.**, 79: 783-786.
  - Maunder J. C. J. (1949): Cattle tick control: results achieved in the field with DDT and BHC. **Queensland Agricultural Journal**, September: 1–8.
  - Maurizi L., Marié J. L., Aoun O., Courtin C., Gorsane S., Chal D., Davoust B. (2010): Seroprevalence survey of equine Lyme borreliosis in France and in sub-Saharan Africa. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, 10(5): 535-537.
  - May C., Bennett D., Carter S. D. (1990): Lyme disease in the dog. **Vet. Rec.**, 126: 293.

- May C., Carter S., Barnes A., Bell S., Bennett D. (1991): Serodiagnosis of Lyme disease in UK dogs. **J. Small. Anim. Pract.**, 32: 170-174.
- Mazepa A. W., Kidd L. B., Young K. M., Trepanier L. A. (2010): Clinical presentation of 26 *Anaplasma phagocytophilum*-seropositive dogs residing in an endemic area. **J Am Anim Hosp Assoc.**, 46: 405-12.
- McDiarmid A. (1965): Modern trends in animal health and husbandry. Some infectious diseases of free-living wild-life. **Brit. Vet. J.**, 121: 245– 257.
- McDougald L. R., Roberson E. L. (1991): farmaci antiprotozoari. In: Booth N. H., McDonald L. E. (Eds.) **Farmacologia e Terapeutica Veterinaria**. EMSI, Roma, 1991: pp 1048-1067.
- McDougall K. W., Machin M. V. (1988). Stabilization of the carbamate acaricide promacyl in cattle dipping fluid. **Pesticide Science**, 22: 307–315.
- McHardy N. (1984): Recent advances in the chemotherapy of theileriosis. **Prev. Vet. Med.**, 2: 179–192.
- McHardy N., Wekesa L. S., Hudson A. T., Randall A. W. (1985): Antitheilerial activity of BW720C (buparvaquone): a comparison with parvaquone. **Res Vet Sci.**, 39: 29-33.
- McKenna P., Clement J., Van Dijck D., Lauwerys M., Carey D., Van den Bogaard T., Bigaignon G. (1995): Canine Lyme disease in Belgium. **Vet. Rec.**, 136: 244-247.
- McNamee P. T., Cule A. P., Donnelly J. (1989): Suspected ehrlichiosis in a gelding in Wales. **Vet. Rec.**, 124: 634–635.
- McQuiston J. H., Childs J. E., Chammerlang M. E., Tarbor E. (2000): Transmission of tick-borne agents of disease by blood transfusion: a review of known and potential risks in the United States. **Transfusion**, 40: 274–84.
- Mdachi R. E., Murilla G. A., Omukuba J. N., Cagnolati V. (1995): Disposition of diminazene aceturate (Berenil®) in trypanosome-infected pregnant and lactating cows. **Vet. Parasitol.**, 58: 215–225.
- Mehlhorn H., Peters W., Haberkorn A. (1980): The formation of kinetes and oocysts in *Plasmodium gallinaceum* and considerations on phylogenetic relationships between Haemosporidia, and other Coccidia. **Protistologica**, 16: 135-154.
- Mehlhorn H., Schein E. (1998): Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. **Parasitology**, 84: 467-475.
- Mehlhorn H., Schein E., Ahmed J. S. (1993): Theileria. In J. P. Kreier (ed.), **Parasitic protozoa**, vol. 7. Academic Press, New York, N.Y, pp. 217–304.
- Mehlhorn H., Schein E. (1984): The piroplasms: life cycle and sexual stages. In: Baker J.R., Muller R. (Eds.) **Advances in Parasitology**. Academic Press, London, UK, 23: 37-103.
- Mehnert W. H., Krause G. (2005): Surveillance of Lyme borreliosis in Germany, 2002 and 2003. **Eurosurveillance**, 10: 83–85.
- Merchant S.R., Ttaboada J. (1991): Dermatology aspects of tick bites and tick transmitted disease. **Vet. Clin. N. Am.**, 21 (1): 145-155.
- Meurice F., Parenti D., Fu D., Krause D. S. (1997): Specific issues in the design and implementation of an efficacy trial for a Lyme disease vaccine. **Clin. Infect. Dis.**, 25(Suppl. 1): S71-75.
- Mhadhbi M., Naouach A., Boumiza A., Chaabani M..F., BenAbderazzak S., Darghouth M..A. (2010): *In vivo* evidence for the resistance of *Theileria annulata* to buparvaquone. **Veterinary parasitology**, 169: 241-247.
- Michael S. A., Morsy T. A., Montasser M. F. (1987) A case of human babesiosis. **J. Egypt. Soc. Parasitol.**, 17: 409-410.
- Michalski M., Rosenfield C., Erickson M., Selle R., Bates K., Essar D., Massung R. F. (2006): *Anaplasma phagocytophilum* in central and western Wisconsin: a molecular survey. **Parasitol. Res.**, 99: 694–699.
- Minami T., Ishihara T. (1980): *Babesia ovata* sp.n. isolated from cattle in Japan. **Natl. Inst. Anim. Health Q (Tokyo)**, 20(3): 101-13.
- Minami T. M., Yamabe K., Hayashi S, Ishihara T. (1979): Serological relationship of Japanese *Babesia* spp. with capillary tube agglutination tests. **Vet. Parasitol.**, 5: 29-38.

- Mirzaei M. (2007): Treatment of natural tropical theileriosis with the extract of the plant *Peganum harmala*. **Korean Journal of Parasitology**, 45 (4): 267-271.
- Miserez V., Gern L., Aeschlimann A. (1990): *Borrelia burgdorferi* in ticks of the Canton Tessin (Switzerland). **Parassitologia**, 32: 293-199.
- Misić-Majerus L.J., Bujic N., Madjaric V., James-Poje V. (2000): First description of the human granulocytic ehrlichiosis in Croatia. **Clin. Microbiol. Infect.**, 6 (Suppl. 1): 194–195.
- Miyamoto K., Hashimoto Y. (1998): Prevention of Lyme borreliosis infection after tick bites [in Chinese]. *Kansenshogaku Zasshi*, 72: 512-516. Citato da Bhate C. e Schwartz R. A. (2011).
- Moffat A. S. (1993): New chemicals seek to outwit insect pest. **Science**, 261: 550-551.
- Mommert S., Gutzmer R., Kapp A., Werfel T. (2001): Sensitive detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA and differentiation of *Borrelia* species by LightCycler PCR. **J. Clin. Microbiol.**, 39: 2663–2667.
- Monari P., Farisoglio C., Calzavara Pinton P. G. (2007): *Borrelia burgdorferi*-associated primary cutaneous marginal-zone B-cell lymphoma: a case report. **Dermatology**, 215: 229-232.
- Moore J. A., Kuntz R. E. (1981): *Babesia microti* infections in nonhuman primates. **J. Parasitol.**, 67: 454–456.
- Moreau Y., Vidor E., Bissuel G. e Dubreuil N. (1989): Vaccination against canine babesiosis: an overview of field observations. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 83(Suppl): 95–96.
- Morisod A., Brossard M., Lambert C., Suter H., Aeschlimann A. (1972): *Babesia bovis*: transmission par *Ixodes ricinus* (Ixodidae) dans la plaine du Rhone. **Schweizer Arch. f. Tierheil.**, 114: 387-394.
- Morissette E., Massung R. F., Foley J. E., Alleman A. R., Foley P., Barbet AF. (2009): Diversity of *Anaplasma phagocytophilum* strains, USA. **Emerg Infect Dis.**, 15: 928-931.
- Moro M. H., David C. S., Magera J. M., Wettstein P. J., Barthold S. W., Persing D. H. (1998): Differential effects of infection with a *Babesia*-like piroplasm, WA1, in inbred mice. **Infect. Immun.**, 66: 492–498.
- Morrison T. B., Ma Y., Weis J. H., Weis J. J. (1999): Rapid and sensitive quantification of *Borrelia burgdorferi*-infected mouse tissues by continuous fluorescent monitoring of PCR. **J. Clin. Microbiol.**, 37: 987–992.
- Morshed M. G., Scott J. D., Fernando K., Geddes G., McNabb A., Mak S., Durden L. A. (2006): Distribution and characterization of *Borrelia burgdorferi* isolates from *Ixodes scapularis* and presence in mammalian hosts in Ontario, Canada. **J. Med. Entomol.**, 43: 762-773.
- Motaleb M. A., Corum L., Bono J. L., Elias A. F., Rosa P., Samuels D. S., Charon N. W. (2000): *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97: 10899-10904.
- Mott J., Rikihisa Y. (2000): Human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits superoxide anion generation by human neutrophils. **Infect. Immun.**, 68: 6697-6703.
- Mott J., Rikihisa Y., Tsunawaki S. (2002): Effects of *Anaplasma phagocytophila* on NADPH oxidase components in human neutrophils and HL-60 cells. **Infect. Immun.**, 70: 1359–1366.
- Müllegger R. R. (2001): Clinical aspects and diagnosis of erythema migrans and borreliac lymphocytoma. **Acta Derm Venereol (Ljubljana)**, 10: 152-158.
- Müllegger R. R. (2004): Dermatological manifestations of Lyme borreliosis. **Eur. J. Dermatol.**, 14: 296-309.
- Munderloh U. G., Blouin E. F., Kocan K. M., Ge N. L., Edwards W. L., Kurtti T. J. (1996a): Establishment of the tick (Acari: Ixodidae)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture. **J Med Entomol.**, 33: 656-664.
- Munderloh U. G., Jauron S. D., Fingerle V., Leitritz L., Hayes S. F., Hautman J. M., Nelson C. M., Huberty B. W., Kurtti T. J., Ahlstrand G. G., Greig B., Mellencamp M. A. e Goodman J. L. (1999): Invasion and intracellular development of the human granulocytic ehrlichiosis agent in tick cell culture. **J. Clin. Microbiol.**, 37: 2518-2424.
- Munderloh U. G., Lynch M. J., Herron M. J., Palmer A. T., Kurtti T. J., Nelson R. D., Goodman J. L. (2004): Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*.

- Vet Microbiol.**, 101: 53–64.
- Munderloh U. G., Madigan J. E., Dumles J. S., Goodman J. L., Hayes S. F., Barlough J. E., Nelson C. M., Kurtti T. J. (1996b): Isolation of the equine granulocytic ehrlichiosis agent, *Ehrlichia equi*, in tick cell culture. **J. Clin. Microbiol.** 34: 664–670.
  - Muniz R. A., Hernandez F., Lombardero O., Leite R. C., Moreno J., Errecalde J., Goncalves L. C. (1995). Efficacy of injectable doramectin against natural *Boophilus microplus* infestations in cattle. **Am. J. Vet. Res.**, 56: 460–463
  - Murphy T. M., Gray J. S., Langley R. J. (1986): Effects of rapid passage in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) on the course of infection of the bovine piroplasm *Babesia divergens* in splenectomised calves. **Res. Vet. Sci.**, 40: 285–287.
  - Musoke A. J., Nantulya V. M., Rurangira F. R., Buscher G. (1984): Evidence for a common protective antigenic determinant on sporozoites of several *Theileria parva* strains. **Immunology**, 52: 231–238.
  - Mwangi E. N., Hassan S. M., Kaaya G. P., Essijman S. (1997): The impact of *Ixodiphagus hookeri*, a tick parasitoid, on *Amblyonnnna variegatum* (Acari : Ixodidae) in a field trial in Kenya. **Exp . App. Acarol.**, 21: 117–126.
  - Nadelman R. B., Horowitz H. W., Hsieh T. C., Wu J. M., Aguero-Rosenfeld M. E., Schwartz L., Nowakowski J., Varde S. e Wormser G. P. (1997): Simultaneous human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis. **N. Engl. J. Med.**, 337: 27–30.
  - Nadelman R. B., Nowakowski J., Forseter G., Goldberg N. S., Bittker S., Cooper D., Varde S., Moy F. H., Forseter G., Pavia C. S., Schwartz I. (1996): The clinical spectrum of early Lyme borreliosis in patients with culture-confirmed erythema migrans. **Am. J. Med.**, 100: 502–508.
  - Nadelman R. B., Wormser G. P. (1998): Lyme borreliosis. **Lancet**, 352: 557–565.
  - Naessens J., Newson J., Bensaid A., Teale A. J., Magondou J. G., Black S. J. (1985): De novo expression of T cell markers on *Theileria parva* transformed lymphoblasts in cattle. **J. Immunol.**, 135: 4183–4188.
  - Navarrete I., Serrano F. J., Reina D. (1999): Babesiosis e Theileriosis, Parasitosis hemáticas. In Cordero del Campillo M., Rojo Vazquez F. A., Martinez Frnandez A. R., Sanchez Acedo M. C., Hernandez Rodriguez S., Navarrete Lopez-Cozar, Diez Banos P., Quisoz Romero H., Carvalho Varela M. (Eds.), Parasitologia veterinaria, McGraw-Hill-Interamericana de Espana, S. A. U., Madrid, España, pp: 283–305.
  - Nazzi F., Martinelli E., Del Fabbro S., Bernardinelli I., Milani N., Iob A., Pischutti P., Campello C., D'Agaro P. (2010): Ticks and Lyme borreliosis in an alpine area in northeast Italy. **Med. Vet. Entomol.**, 24: 220–226.
  - Nicholson W. L., Castro M. B., Kramer V. L., Sumner J. W., Childs J. E. (1999): Duskyfooted wood rats (*Neotoma fuscipes*) as reservoirs of granulocytic *Ehrlichiae* (Rickettsiales: Ehrlichieae) in northern California. **J. Clin. Microbiol.**, 37: 3323– 3327.
  - Nieto N. C., Foley J. E., Bettaso J. e Lane R. S. (2009): Reptile infection with *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of granulocytic anaplasmosis. **J. Parasitol.**, 95: 1165–1170.
  - Nieto, N.C., Foley, J.E. (2009): Reservoir competence of the redwood chipmunk (*Tamias ochrogenys*) for *Anaplasma phagocytophilum*. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, 9: 573–577.
  - Niu H., Rikihisa Y., Yamaguchi M. e Ohashi N. (2006): Differential expression of VirB9 and VirB6 during the life cycle of *Anaplasma phagocytophilum* in human leucocytes is associated with differential binding and avoidance of lysosome pathway. **Cell. Microbiol.**, 8: 523–534.
  - Nocton J. J., Dressler F., Rutledge B. J., Rys P. N., Persing D. H., Steere A. C. (1994): Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. **N. Engl. J. Med.**, 330: 229–234.
  - Nolan J., Roulston W. J., Schnitzerling H. J. (1979). The potential value of some synthetic pyrethroids for control of the cattle tick (*Boophilus microplus*). **Australian Vet. J.**, 55: 463–466.
  - Nordstrand A., Barbour A. G., Bergstrom S. (2000): *Borrelia* pathogenesis research in the post-genomic and post-vaccine era. **Curr. Opin. Microbiol.**, 3 :86–92.

## Bibliografia

- Norval R. A. I., Horak I. G. (2004): Ticks. In: Coetzer J.A.W., Tustin R.C. (Eds.) **Infectious Disease of Livestock**. 2<sup>nd</sup> Ed., Oxford University Press, pp. 3-42.
- Norval R. A. I., Perry B. D., Young A. S. (1992): The Epidemiology of Theileriosis in Africa. 1<sup>st</sup> edn. London, Academy Press.
- Norval R. A. I., Sonenshine D. E., Allan S. A., Burridge M. J. (1996): Efficacy of pheromone-acaricide impregnated tail-tag decoys for controlling the bont tick, *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae), on cattle in Zimbabwe. **Exp. App. Acarol.**, 20: 31–46.
- Nosek J. (1972): The ecology and public health importance of *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks in Central Europe. **Folia Parasitologica**, 19: 93–102.
- Nuttal G. H. F., Warburton C., Cooper W. F., Robinson L. E. (1908): Tick. A monograph of the Ixodoidea. Part I: the Argasidae. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 1-104.
- Nyarko E., Grab D. J., Dumler J. S. (2006): *Anaplasma phagocytophilum*-infected neutrophils enhance transmigration of *Borrelia burgdorferi* across the human blood brain barrier in vitro. **Int J Parasitol.**, 36: 601–605.
- Nygard K. K., Brantsaeter A. B., Mehl R. (2005): Disseminated and chronic Lyme borreliosis in Norway, 1995–2004. **Eurosurveillance**, 10: 235–238.
- Nyindo M. B. A., Ristic M., Lewis G. E., Huxsoll D. L., Stephenson E.H. (1978): Immune responses of ponies to experimental infection with *Ehrlichia equi*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 180: 512–514. Citato da Woldehiwet Z., 2010.
- Obonyo M., Munderloh U. G., Fingerle V., Wilske B., Kurtti T. J. (1999): *Borrelia burgdorferi* in tick cell culture modulates expression of outer surface proteins A and C in response to temperature. **J. Clin. Microbiol.**, 37: 2137–2141.
- Ochanda H., Young A. S., Wells C., Medley G. F., Perry B. D. (1996): Comparison of the transmission of *Theileria parva* between different instars of *Rhipicephalus appendiculatus*. **Parasitology**, 113: 243-253.
- O'Conner T. P., Esty K. E., Hanscom J. L., Shields P., Philipp M. T. (2004): Dogs vaccinated with common Lyme disease vaccines do not respond to IR6 the conserved immunodominant region of the VlsE surface protein of *Borrelia burgdorferi*. **Clin. Lab. Immun.**
- Ogden N. H., Bown K. J., Horrocks B. K., Woldehiwet Z., Bennett M. (1998a): Granulocytic *Ehrlichia* infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. **Med. Vet. Entomol.**, 12: 423–429.
- Ogden N. H., Casey A. N. J., French N. P., Bown K. J., Adams J. D. W., Woldehiwet Z. (2002a): Natural *Ehrlichia phagocytophila* transmission coefficients from sheep 'carriers' to *Ixodes ricinus* ticks vary with the numbers of feeding ticks. **Parasitology**, 124: 127–136.
- Ogden N. H., Casey A. N. J., French N. P., Woldehiwet Z. (2002b): A review of studies on the transmission of *Anaplasma phagocytophilum* from sheep: implications for the force of infection in endemic cycles. *Exp. Appl. Acarol.*, 28: 195–202.
- Ogden N. H., Casey A. N. J., Lawrie C., French N. P., Woldehiwet Z., Carter S. D. (2002c): IgG responses to salivary gland extract of *Ixodes ricinus* ticks vary inversely with resistance in naturally exposed sheep. **Med. Vet. Entomol.**, 16: 186–192.
- Ogden N. H., Casey A. N. J., Woldehiwet Z., French N. P. (2003): Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* to *Ixodes ricinus* ticks from sheep in the acute and post-acute phase of infection. **Infect. Immun.**, 71: 2071–2078.
- Ogden N. H., Woldehiwet Z., Hart C. A. (1998b): Granulocytic Ehrlichiosis: an emerging or rediscovered tick-borne disease. **J. Med. Microbiol.** 47: 475–482.
- Ogrinc K., Ružić-Sabljic E., Strle F. (2008): Clinical assessment of patients with suspected Lyme borreliosis. **Int. J. Med. Microbiol.**, 298(Suppl. 1): 356-360.
- Ohashi N., Zhi N., Lin Q., Rikihisa Y. (2002): Characterization and transcriptional analysis of gene clusters for a type IV secretion machinery in human granulocytic and monocytic ehrlichiosis agents. **Infect. Immun.**, 70: 2128–2138.
- Ohashi N., Inayoshi M., Kitamura K., Kawamori F., Kawaguchi D., Nishimura Y., Naitou H., Hiroi M., Masuzawa T. (2005): *Anaplasma phagocytophilum*-infected ticks, Japan. **Emerg. Infect. Dis.**, 11(11):1780-1783.

## Bibliografia

- Ohashi N., Zhi N., Zhang Y. e Rikihisa Y. (1998): Immunodominant major outer membrane proteins of *Ehrlichia chaffeensis* are encoded by a polymorphic multigene family. **Infect Immun.**, 66(1):132-139.
- Ohnishi J., Piesman J., de Silva A. M. (2001): Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 98: 670-675.
- Olano J. P., Aguero-Rosenfeld M. E. (2007): Ehrlichia, Anaplasma, and Related Intracellular Bacteria. In Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Landry M. L., Pfaller M. A. (Eds.): Manual of Clinical Microbiology, Volume 1, American Society for Microbiology, Washington DC, USA, pp: 1046-1061.
- Oldak E., Flisiak I., Chodyncka B. (2009): Lyme disease in children. **Przegl. Dermatol.**, 96: 146-151.
- Oldak E., Sulik A., Dorota R. (2008): The significance of immunoblot tests in diagnosis of Lyme borreliosis in children [in Czech]. **Przegl. Epidemiol.**, 62(suppl): 83-87. Citato da Bhate C. e Schwartz R. A. (2011b).
- Ole-MoiYoi O. K., Brown W. C., Iams K. P., Nayar A., Tsukamoto T., Macklin M. D. (1993): Evidence for the induction of casein kinase II in bovine lymphocytes transformed by the intracellular protozoan parasite *Theileria parva*. **EMBO J.** 12: 1621–1631.
- Ole-MoiYoi O. K., Nayar A., Iams K., Musoke A. J., Yilma T. (1989): Molecular aspects of *Theileria parva* and approaches to vaccine development for animals. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 569: 174–182.
- Olivares J. P., Pallas F., Ceccaldi M., Viton J. M., Raoult D., Planche D., Delarque A. (1995): Lyme disease presenting as isolated acute urinary retention caused by transverse myelitis: an electrophysiological and urodynamical study. **Arch Phys Med Rehabil.**, 76: 1171-1172.
- Olmeda A. S., Armstrong P. M., Rosenthal B. M., Valladares B., del Castillo A., de Armas F., Miguelez M., González A., Rodríguez Rodríguez J. A., Spielman A., Telford S. R. 3rd. (1997): A subtropical case of human babesiosis. **Acta Trop.**, 67: 229-234.
- Ong K. R., Stavropoulos C., Inada Y. (1990): Babesiosis, asplenia, and AIDS. **Lancet**, 336: 112.
- Osorno B. M., Vega C., Ristia M., Robles C., Ibarra S. (1976): Isolation of *Babesia* spp. from asymptomatic human being. **Vet. Parasitol.**, 2: 111-120.
- Ostfeld R. S., Canham C. D., Oggenfuss K., Winchcombe R. J., Keesing F. (2006): Climate, deer, rodents, and acorns as determinants of variation in lyme-disease risk. **PLoS Biol.**, 4: e145.
- Oteo J. A., Blanco J. R., de Artola V., Ibarra V. (2000): First report of human granulocytic ehrlichiosis in southern Europe (Spain). **Emerg. Infect. Dis.**, 6: 430–431.
- Oteo J. A., Blanco J. R., Ibarra V. (2001a): Can we prevent tickborne transmission disease? **Enferm Infecc Microbiol Clin.**, 19: 509–513.
- Oteo J. A., Gil H., Barral M., Pérez A., Jimenez S., Blanco J. R., Martínez de Artola V., García-Pérez A., Juste R. A. (2001): Presence of granulocytic ehrlichia in ticks and serological evidence of human infection in La Rioja, Spain. **Epidemiol Infect.**, 127: 353–8.
- Otranto D., Dantas-Torres F. (2010): Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. **Parasites Vectors**, 3: 2.
- Otranto D., Traversa D. (2010): Parassiti degli equini. In: Taylor M. A., Coop R. L. e Wall R. L. (Eds) **Parassitologia e malattie parassitarie degli animali**. EMSI, Roma, Italia, pp: 261-317.
- Øverås J., Lund A., Ulvund M. J., Waldeland H. (1993): Tick-borne fever as a possible predisposing factor in septicaemic pasteurellosis in lambs. **Vet Rec.**, 133: 398.
- Øverås J. (1962): Tick-borne fever (sjodogg) hos storfe. **Norsk Veterinaertidsskrift**, 14: 631–641. Citato da Woldehiwet Z., 2010.
- Pachner A. R., Steere A. C. (1985): The triad of neurologic manifestations of Lyme disease: meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis. **Neurology**, 35: 47-53.
- Paddock C. D., Childs J. E. (2003): Ehrlichia chaffeensis: a Prototypical Emerging Pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.**, 16: 37–64.
- Pal U., Yang X., Chen M., Bockenstedt L. K., Anderson J. F., Flavell R. A., Norgard M. V.,



- Fikrig E. (2004): OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. **J. Clin. Invest.**, 113: 220-230.
- Palmer B. H., McCarthy J. F., Kozlik A., Harrison, I. R. (1971). A new chemical group of cattle acaricides. *Proceedings of the 3rd International Congress of Acarology*, Prague, pp. 687–691.
  - Palmer G. H., Machado J. Jr., Fernandez P., Heussler V., Perinat T., Dobbelaere D. A. (1997): Parasite-mediated nuclear factor kappaB regulation in lymphoproliferation caused by *Theileria parva* infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 94: 12527–12532.
  - Pantchev N., Schaper R., Limousin S., Norden N., Weise M., Lorentzen L. (2009): Occurrence of *Dirofilaria immitis* and tickborne infections caused by *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* in domestic dogs in France: results of a countrywide serologic survey. **Parasitol. Res.**, 105: S101–S113.
  - Park J., Choi K. S., Dumler J. S. (2003): Major surface protein 2 of *Anaplasma phagocytophilum* facilitates adherence to granulocytes. **Infect Immun.**, 71: 4018–4025.
  - Parker J. L., White K. K. (1992): Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature. *Cornell Vet.*, 82(3): 253-274.
  - Parola P., Raoult D. (2001a): Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. **Clin. Microbiol. Infect.**, 7: 80–3.
  - Parola P., Raoult D. (2001b): Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clin Infect Dis.**, 32: 897–928.
  - Parrodi F., Jacobson R. H., Wright I. G., Fitzgerald C. J., Dobson C. (1991): The effect of immune serum and complement on the in vitro phagocytosis of *Babesia rodhaini*. **Parasitol. Immunol.**, 13: 457-471.
  - Passamonti F., Veronesi F., Cappelli K., Capomaccio S., Coppola G., Marenzoni M. L., Piergili Fioretti D., Verini Supplizi A., Coletti M. (2010): *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks: a preliminary survey of Central Italy. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, 33(1):73-83.
  - Pavan W. O. (2009): Local epidemiology and clinical manifestations of Lyme disease. **Int. J. Med. Sci.**, 6: 123.
  - Paxton E. A., Scott G.R. (1989): Detection of antibodies to the agent of tick-borne fever by indirect immunofluorescence. **Vet. Microbiol.**, 21: 133– 138.
  - Peddireddi L., Cheng C., Ganta R. R. (2009): Promoter analysis of macrophage- and tick cell-specific differentially expressed *Ehrlichia chaffeensis* p28-Omp genes. **BMC Microbiol.**, 9: 99.
  - Pedra J. H., Sutterwala F. S., Sukumaran B., Ogura Y., Qian F., Montgomery R. R., Flavell R. A., Fikrig E. (2007b): ASC/ PYCARD and Caspase-1 regulate the IL-18/IFN-gamma axis during *Anaplasma phagocytophilum* infection. **J Immunol.**, 179: 4783–4791.
  - Pedra J. H., Tao J., Sutterwala F. S., Sukumaran B., Berliner N., Bockenstedt L. K., Flavell R. A., Yin Z., Fikrig E. (2007a): IL-12/23p40-dependent clearance of *Anaplasma phagocytophilum* in the murine model of human anaplasmosis.,50: 401–410.
  - Pejchalová K., Zákorská A., Mejzlíková M., Halouzka J., Dendis M. (2007): Isolation, cultivation and identification of *Borrelia burgdorferi* genospecies from *Ixodes ricinus* ticks from the city of Brno, Czech Republic. **Ann Agric Environ Med.**, 14:75-79.
  - Peltomaa M., Pyykko I., Sappala I., Viitanen L., Viljanen M. (2000): Lyme borreliosis, an etiological factor in sensorineural hearing loss? **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.**, 257: 317-322.
  - Peltomaa M., Pyykko I., Seppala I., Viljanen M. (1998): Lyme borreliosis—an unusual cause of vertigo. **Auris Nasus Larynx**, 25: 233-242.
  - Peltomaa M., Pyykko I., Seppälä I., Viljanen M. (2002): Lyme borreliosis and facial paralysis—a prospective analysis of risk factors and outcome. **Am. J. Otolaryngol.**, 23: 125-132.
  - Perret J. L., Guigoz E., Rais O., Gern L. (2000): Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). **Parassitol. Res.**, 86: 554-557.
  - Perry B. D., Nichols D. K., Cullom E. S. (1985): *Babesia odocoilei* Emerson e Wright, 1970, in white-tailed deer, *Odocoileus virginianus* (Zimmermann), in Virginia. **Journal of Wildlife Diseases**, 21: 149-152.

## Bibliografia

- Persing D. H., Herwaldt B. L., Glaser C., Lane R. S., Thomford J. W., Mathiesen D., Krause P. J., Phillip D. F., Conrad P. A. (1995): Infection with a *Babesia*-like organism in northern California. **N. Engl. J. Med.**, 332: 298-303.
- Persing D. H., Rutledge B. J., Rys P. N., Podzorski D. S., Mitchell P. D., Reed K. D., Liu B., Fikrig E., Malawista S. E. (1994): Target imbalance: disparity of *Borrelia burgdorferi* genetic material in synovial fluid from Lyme arthritis patients. **J. Infect. Dis.**, 169: 668-672.
- Persing, D. H., Mathiesen D., Marshall W. F., Telford S. R. III, Spielman A., Thomford J. W., Conrad P. A. (1992): Detection of *Babesia microti* by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, 30: 2097-2103.
- Petrovec M., Bidovec A., Sumner J. W., Nicholson W. L., Childs J. E., Avsic-Zupanc T. (2002): Infection with *Anaplasma phagocytophila* in cervids from Slovenia: evidence of two genotypic lineages. **Wien. Klin. Wochenschr.**, 31: 641-647.
- Petrovec M., Lotric-Furlan S., Zupanc T. A., Strle F., Brouqui P., Roux V., Dumler J. S. (1997): Human disease in Europe caused by a granulocytic Ehrlichia species. **J. Clin. Microbiol.**, 35: 1556-1559.
- Petrovec M., Sumner J. W., Nicholson W. L. Childs J. E., Strle F., Barlic J., Lotric-Furlan S., Avsic Zupanc T. (1999): Identity of ehrlichial DNA sequences derived from *Ixodes ricinus* ticks with those obtained from patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. **J Clin Microbiol.**, 37: 209-210.
- Pfister H. W., Wilske B., Weber K. (1994): Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. **Lancet**, 343: 1013-1016.
- Philip C. B. (1974): Tribe II. Ehrlichieae Philip 1957. In: R.E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds), Bergey's manual of determinative bacteriology, 8<sup>th</sup> edit. The Williams & Wilkins Company, Baltimore. pp: 893-897. Citato da Suen S., 2007.
- Philipp M. T., Bowers L. C., Fawcett P. T., Jacobs M. B., Liang F. T., Marques A. R., Mitchell P. D., Purcell J. E., Ratterree M. S., Straubinger R. K. (2001): Antibody response to IR6, a conserved immunodominant region of the VlsE lipoprotein, wanes rapidly after antibiotic treatment of *Borrelia burgdorferi* infection in experimental animals and humans. **J. Infect. Dis.**, 184: 870-878.
- Picken R. N., Cheng Y., Strle F., Picken M. M. (1996): Patient isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities of strain 25015. **J. Infect. Dis.**, 174: 1112-1115.
- Picken R. N., Strle F., Picken M. M., Ruzic-Sabljic E., Maraspin V., Lotric-Furlan S., Cimperman J. (1998): Identification of three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii*) among isolates from acrodermatitis chronica atrophicans lesions. **J. Investig. Dermatol.**, 110: 211-214.
- Pieniazek N., Sawczuk M., Skotarczak B. (2006): Molecular identification of *Babesia* parasites isolated from *Ixodes ricinus* ticks collected in northwestern Poland. **J Parasitol.** Feb;92(1):32-5.
- Piesman J. (2006): Strategies for reducing the risk of Lyme borreliosis in North America. **Int. J. Med. Microbiol.**, 296(Suppl. 40): 17-22.
- Piesman J., Dolan M. C. (2002): Protection against lyme disease spirochete transmission provided by prompt removal of nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, 39: 509-512.
- Piesman J., Karakashian S. J., Lewengrub S., Rudzinska M. A., Spielman A. (1986): Development of *Babesia microti* sporozoites in adult *Ixodes dammini*. **Int. J. Parasitol.**, 16: 381-385.
- Piesman J., Lewengrub S., Rudzinska M. A., Spielman A. (1987a): *Babesia microti*: prolonged survival of salivarian piroplasms in nymphal *Ixodes dammini*. **Exp. Parasitol.**, 64: 292-299.
- Piesman J., Mather T. N., Dammin G. J., Telford III S., Lastavica C. C., Spielman A. (1987b): Seasonal variation of transmission risk of Lyme disease and human babesiosis. **Am. J. Epidemiol.**, 126: 1187-1189.
- Piesman J., Mather T. N., Sinsky R. J., Spielman A. (1987c): Duration of tick attachment and

- Borrelia burgdorferi* transmission. **J. Clin. Microbiol.**, 25: 557–558.
- Piesman J., Spielman A. (1982): *Babesia microti*: infectivity of parasites from ticks for hamsters and white-footed mice. **Exp. Parasitol.**, 53: 242–248.
  - Piesman J., Spielman A., Etkind P., Ruebush T. II, Juranek D. D. (1979): Role of deer in the epizootiology of *Babesia microti* in Massachusetts, USA. **J. Med. Entomol.**, 15: 537–540.
  - Piesman J., Zeidner N. S., Schneider B. S. (2003): Dynamic changes in *Borrelia burgdorferi* populations in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) during transmission: studies at the mRNA level. **Vector-Borne Zoon. Dis.**, 3: 125–132.
  - Pietila J., He Q., Oksi J., Viljanen M. K. (2000): Rapid differentiation of *Borrelia garinii* from *Borrelia afzelii* and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by Lightcycler fluorescence melting curve analysis of a PCR product of the *recA* gene. **J. Clin. Microbiol.**, 38: 2756–2759.
  - Pinto D. S. (2002): Cardiac manifestations of Lyme disease. **Med. Clin. North. Am.**, 86: 285–296.
  - Pistone D., Pajoro M., Fabbi M., Vicari N., Marone P., Genchi C., Novati S., Sassera D., Epis S., Bandi C. (2010): Lyme borreliosis, Po River Valley, Italy. **Emerg. Infect. Dis.**, 16: 1289–1291.
  - Plier M. L., Breitschwerdt E. B., Hegarty B. C., Kidd L. B. (2009): Lack of evidence for perinatal transmission of canine granulocytic anaplasmosis from a bitch to her offspring. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, 45: 232–238.
  - Pohl-Koppe A., Wilske B., Weiss M., Schmidt H. (1998): *Borrelia lymphocytoma* in childhood. **Pediatr Infect Dis J.**, 17: 423–426.
  - Poitout F. M., Shinozaki J. K., Stockwell P. J., Holland C. J., Shukla S. K. (2005): Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in western Washington State. **J Clin Microbiol.**, 43: 796–801.
  - Polar P., Kairo M. T. K., Peterkin D., Moore D., Pegram R., John S. A. (2005): Assessment of fungal isolates for development of a myco-acaricide for cattle tick control. **Vector-Borne Zoonotic Dis.**, 5: 276–284.
  - Polin H., Hufnagl P., Haunschmid R., Gruber F., Ladurner G. (2004): Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and wild animals in Austria. **J. Clin. Microbiol.** 42: 2285–2286.
  - Pollack R. J., Telford S. R. III, Spielman A. (1993): Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. **J. Clin. Microbiol.** 31: 1251–1255.
  - Popov V. L., Chen S. M., Feng H. M. e coll. (1995): Ultrastructural variation of cultured Ehrlichia chaffeensis. **J. Med. Microbiol.**, 43: 411–421.
  - Popov V. L., Han V. C., Chen S. M., Dumler J. S., Feng H. M., Andreadis T. G., Tesh R. B., Walker D. H. (1998): Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. **J. Med. Microbiol.**, 47: 235–251.
  - Postic D., Assous M. V., Grimont P. A., Baranton G. (1994): Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf* (5S)-*rrl* (23S) intergenic spacer amplicons. **Int J Syst Bacteriol.**, 44(4): 743–752.
  - Postic, D., Garnier M., Baranton G. (2007): Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates—description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. **Int. J. Med. Microbiol.**, 297: 263–271.
  - Pound J. M., Miller J. A., George J. E., Lemeilleur C. A. (2000): The “4-poster” passive topical treatment device to apply acaricide for controlling ticks (Acari: Ixodidae) feeding on white-tailed deer. **J. Med. Entomol.**, 37: 588–594
  - Preac-Mursic V., Pfister H. W., Spiegel H., Burk R., Wilske B., Reinhardt S., Bohmer R. (1993): First isolation of *Borrelia burgdorferi* from an iris biopsy. **J. Clin. Neuroophthalmol.**, 13: 155–161.
  - Preac-Mursic V., Wilske B., Reinhardt S. (1991): Culture of *Borrelia burgdorferi* on six solid media. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 10: 1076– 1079.
  - Preac-Mursic V., Wilske B., Schierz G. (1986): European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks culture conditions and antibiotic susceptibility. **Zentbl. Bakterirol. Mikrobiol.**

- Hyg. A.**, 263: 112–118. Citato da Aguero-Rosenfeld e coll., 2005.
- Preac-Mursic V., Wilske B., Schierz G., Pfister H. W., Einhäupl K. M. (1984): Repeated isolation of spirochetes from the cerebrospinal fluid of a patients with meningoradiculitis Bannwarth. **Eur. J. Clin. Microbiol.**, 3: 564– 565. Citato da Aguero-Rosenfeld e coll., 2005.
  - Pruthi R. K., Marshall W. F., Wiltsie J. C., Persing D. H. (1995): Human babesiosis. **Mayo Clin. Proc.**, 70: 853–862.
  - Psaroulaki A., Chochlakis D., Ioannou I., Florentia A., Gikas A., Tselentis Y. (2009): Acute anaplasmosis in humans in Cyprus. **Clin Microbiol Infect.**, 15 Suppl 2: 10-11.
  - Puccini V., Lo Muzio F., Giannubilo G. (1958): Efficacia del “Berenil” nella cura della piroplasmosi suina da *Piroplasma trautmanni* e da *Babesiella perroncitoi*. **Vet. Ital.**, 9: 611-616.
  - Pudney M., Gray J. S. (1997): Therapeutic efficacy of atovaquone against the bovine intraerythrocytic parasite, *Babesia divergens*. **J. Parasitol.**, 83: 307-310.
  - Pugliese A., Beltramo T., Torre D. (2007): Seroprevalence study of Tick-borne encephalitis, *Borrelia burgdorferi*, Dengue and Toscana virus in Turin Province. **Cell. Biochem. Funct.**, 25: 185-188.
  - Purnell R. E., Brocklesby D. W., Hendry D. J., Stark A. J., Young E. R. (1977): *Babesia divergens* in splenectomised calves: titration of the infective dose. **Res. Vet. Sci.**, 23: 124-125.
  - Purnell R. E., Lewis D., Young E. R. (1980): Investigations on the prophylactic effect of treatment with imidocarb dipropionate on *Babesia divergens* infections in splenectomised calves. **Br. Vet. J.**, 136: 452–456.
  - Purnell R.E. (1981): Babesiosis, In Ristic M. e Kreier J.P (Eds), Babesiosis in various hosts, Academic Press, New York, 25-63.
  - Pusterla N., Anderson R. J., House J. K., Pusterla J. B., DeRock E., Madigan J. E. (2001). Susceptibility of cattle to infection with *Ehrlichia equi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 218: 1160–1162.
  - Pusterla N., Huder .J, Wolfensberger C., Litschi B, Parvis A, Lutz H. (1997): Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland. **J. Clin. Microbiol.**, 35: 2307-2309.
  - Pusterla N., Huder J. B., Feige K., Lutz H. (1998a): Identification of a granulocytic *Ehrlichia* strain isolated from a horse in Switzerland and comparison with other rickettsiae of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup. **J. Clin. Microbiol.**, 36: 2035–2037.
  - Pusterla N., Leutenegger C. M., Chae J. S., Lutz H., Kimsey R. B., Dumler J. S., Madigan J. E. (1999a): Quantitative evaluation of ehrlichial burden in horses after experimental transmission of human granulocytic *Ehrlichia* agent by intravenous inoculation with infected leukocytes and by infected ticks. **J. Clin. Microbiol.**, 37: 4042-4044.
  - Pusterla N., Madigan J. E. (2007): Anaplasma phagocytophila. In Sellon D. C. e Long M. T. (Eds): Equine infectious diseases. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, 2007, pp: 354-357.
  - Pusterla N., Pusterla J. B., Braun U., Lutz H. (1999b): Experimental cross-infections with Ehrlichia phagocytophila and human granulocytic ehrlichia-like agent in cows and horses. **Vet Rec.**, 145: 311–314.
  - Pusterla N., Weber R., Wollfensberger C., Schär G., Zbinden R., Fierz W., Madigan J. E., Dumler J. S., Lutz H. (1998b): Serologic evidence of human granulocytic ehrlichiosis in Switzerland. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 17: 207–209.
  - Puzii A. D., Serov V. M. (1983) Persistence of pegarmin (a preparation of the alkaloids of *Peganum harmala*) in the body (of cattle). **Veterinariia**, 5: 62-64.
  - Quessada T., Martial-Convert F., Arnaud S., Leudet De La Vallee H., Gilot B., Pichot J. (2003): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* species and identification of *Borrelia valaisiana* in questing Ixodes ricinus in the Lyon region of France as determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, 22(3):165-173.
  - Quick R. E., Herwaldt B. L., Thomford J. W., Garnett M. E., Eberhard M. L., Wilson M., Spach D. H., Dickerson J. W., Telford III S. R., Steingart K. R., Pollock R., Persing D. H., Kobayashi

- J. M., Juranek D. D. Conrad P. A. (1993): Babesiosis in Washington State: a new species of *Babesia*? **Ann. Int. Med.**, 199: 284-290.
- Ranatunga P., Wanduragala L. (1974): Reactions and haematology in imported jersey cattle premunized in Ceylon. **Brit. Vet. J.**, 128: 9-18.
  - Rand P. W., Lubelczyk C., Holman M. S., Lacombe E. H., Smith R. P. Jr. (2004): Abundance of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) after the complete removal of deer from an isolated offshore island, endemic for Lyme disease. **J. Med. Entomol.**, 41: 779-784.
  - Randolph S. E., Green R. M., Hoodless A. N., Peacey M. F. (2002): An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. **Int. J. Parasitol.**, 32: 979-989.
  - Raoult D., Lakos A., Fenollar F., Beytout J., Brouqui P., Fournier P.E. (2002): Spotless rickettsiosis caused by *Rickettsia slovaca* and associated with *Dermacentor* ticks. **Clin. Inf. Dis.**, 34, 1331-1336.
  - Rar V. A., Epikhina T. I., Livanova N. N., Panov V. V., Doroschenko E. K., Pukhovskaia N. M., Vysochina N. P., Ivanov L.I. (2011): Genetic variability of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes persulcatus* ticks and small mammals in the Asian part of Russia. **Vector-Borne and Zoonotic Dis.**, 11: 1013–1021.
  - Rar V. A., Livanova N. N., Panov V. V., Doroschenko E. K., Pukhovskaia N. M., Vysochina N. P., Ivanov L. I. (2010): Genetic diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia* in Asian part of Russia. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 1: 57–65.
  - Rar V., Golovljova I. (2011): *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “*Candidatus* Neoehrlichia” bacteria: Pathogenicity, biodiversity and molecular genetic characteristics, a review. **Inf. Gen. Evol.**, 11: 1842-1861.
  - Rauter C., Hartung T. (2005): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. **Appl. Environ. Microbiol.**, 71(11): 7203-7216.
  - Rauter C., Oehme R., Diterich I., Engele M., Hartung T. (2002): Distribution of clinically relevant borrelia genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR. **J. Clin. Microbiol.**, 40: 36–43.
  - Raveche E. S., Schutzer S. E., Fernandes H., Bateman H., McCarthy B. A., Nickell S. P., Cunningham M. W. (2005): Evidence of *Borrelia* autoimmunity-induced component of Lyme carditis and arthritis. **J. Clin. Microbiol.**, 43: 850-856.
  - Ravnik U., Tozon N., Smrdel K. S., Zupanc T. A. (2011): Anaplasmosis in dogs: the relation of haematological, biochemical and clinical alterations to antibody titre and PCR confirmed infection. **Vet. Microbiol.**, 149: 172-176.
  - Ravnik U., Tozon N., Strasek K., Avsic Zupanc T. (2009): Clinical and haematological features in *Anaplasma phagocytophilum* seropositive dogs. **Clin. Microbiol. Infect.**, 15: 39-40.
  - Ravyn M. D., Goodman J. L., Kodner C. B., Westad D. K., Coleman L. A., Engstrom S. M., Nelson C. M e Johnson R. C. (1998): Immunodiagnosis of human granulocytic ehrlichiosis by using culture-derived human isolates. **J. Clin. Microbiol.**, 36: 1480-1488.
  - Ravyn M. D., Kodner C. B., Carter S. E., Jarnefeld J. L., Johnson R. C. (2001): Isolation of the etiologic agent of human granulocytic ehrlichiosis from the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*). **J Clin Microbiol.**, 39(1): 335-338.
  - Reed K. D. (2002): Laboratory testing for Lyme disease: possibilities and practicalities. **J. Clin. Microbiol.**, 40: 319–324.
  - Rees C. W. (1934): Characteristics of the piroplasm *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* in the United States. **J. Agric. Res.**, 48: 427-438.
  - Rehbein G., Zwegarth E., Voight V. P., Schein E. (1982): Establishment of *Babesia equi*-infected lymphoblastoid cell lines. **Z. Parasite**, 67: 125-127.
  - Reichard M. V., Roman R. M., Kocan K. M., Blouin E. F., de la Fuente J., Snider T. A., Heinz R. E., West M. D., Little S. E., Massung R.F. (2009): Inoculation of whitetailed deer (*Odocoileus virginianus*) with Ap-V1 or NY-18 strains of *Anaplasma phagocytophilum* and microscopic demonstration of Ap-V1 in *Ixodes scapularis* adults that acquired infection from deer as nymphs. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, 9: 565–568.

- Rejmanek D, Bradburd G, Foley J. (2011) Molecular characterization reveals distinct genospecies of *Anaplasma phagocytophilum* from diverse North American hosts. *J Med Micro. In-Press*.
- Remington B., Kieran P., Cobb R., Boderio, D. (1997). The application of moxidectin formulations for control of the cattle tick (*Boophilus microplus*) under Queensland field conditions. **Australian Vet. J.**, 75: 588–591.
- Reye A. L., Hübschen J. M., Sausy A., Muller C. P. (2010): Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. **Appl Environ Microbiol.**, 76: 2923-2931.
- Reyers F., Leisewitz A. L., Lobetti R. G., Milner R. J., Jacobson L. S., Van Zyl M. (1998): Canine babesiosis in South Africa: more than one disease does this serve as a model for falciparum malaria? **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 92: 503-511.
- Ribeiro J. M. (1987): Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annu. Rev. Entomol.**, 32: 463–478.
- Rice Conlon J. A., Mather T. N., Tanner P., Gallo G., Jacobson R. H. (2000): Efficacy of a nonadjuvanted, outer surface protein A recombinant vaccine in dogs after challenge by ticks naturally infected with *Borrelia burgdorferi*. **Vet Ther.**, 1: 96-107.
- Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Matuschka F. R., Baranton G. (2006): Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 56: 873-881.
- Richter P., Kimsey R., Madigan J. Barlough J., Dumler J. e Brooks D. (1996): *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) as vector of *Ehrlichia equi* (Rickettsiales: Ehrlichieae). **J. Med. Entomol.**, 33: 1-5.
- Riek R. F. (1968): Babesiosis, In Weinman D. and Ristic M. (Ed.), Infectious blood diseases of man and animals, vol. 2. Academic Press, New York, N.Y., pp 219–268.
- Rihikisa Y. (1999): Clinical and biological aspects of infections caused by *Ehrlichia chaffeensis*. **Microbes. Infect.**, 1: 367-376.
- Rijpkema S. G., Tazelaar D. J., Molkenboer M. J., Noordhoek G. T., Plantinga G., Schouls L. M., Schellekens J. F. (1997): Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. **Clin. Microbiol. Infect.**, 3: 109–116.
- Rikihisa Y. (1991): The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, 4: 286–308.
- Rikihisa Y. (2006a): Ehrlichia subversion of host innate responses. **Curr Opin Microbiol.**, 9: 95–101.
- Rikihisa Y. (2006b): New findings on members of the family *Anaplasmataceae* of veterinary importance. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1078: 438–445.
- Rikihisa Y. (2011): Mechanisms of Obligatory Intracellular Infection with *Anaplasma phagocytophilum*. **Clin. Microbiol. Rev.**, 24: 469–489.
- Rikihisa Y., Lin M. (2010): *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis* type IV secretion and Ank proteins. *Current Opinion in Microbiology*, 13: 59–66.
- Rintelen M., Schein E., Ahmed J. S. (1990): Buparvaquone but not cyclosporin A prevents *Theileria annulata*-infected bovine lymphoblastoid cells from stimulating uninfected lymphocytes. **Trop. Med. Parasitol.**, 41: 203–207.
- Ristic M., Conroy J. D., Siwe S., Healy G. R., Smith A. R., Huxsoll D. L. (1971): *Babesia* species isolated from a woman with clinical babesiosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 20: 14-22.
- Rizzoli A., Hauffe H. C., Carpi G., Vourc'h G. I., Neteler M., Rosà R. (2011): Lyme borreliosis in Europe. **Euro Surveill.**, 16(27):pii=19906.
- Rizzoli A., Tagliapietra V., Chemini C., Lui A., Genchi C. (2000): Caratteristiche biologiche e ruolo patogeno delle zecche. **Centro di Ecologia Alpina, Report** 21: 3-10.
- Rocchi M. S., Ballingall K. T., Ngugi D., Machugh N. D., McKeever D. J. (2008): A rapid and sensitive intracellular flow cytometric assay to identify *Theileria parva* infection within target cells. **Parasitology**, 135 (2), pp 195-201

## Bibliografia

- Rodriguez O. N., Isabel M., Dias R. T., Rodriguez P. (1984): Report on infection with *Babesia bovis* (Babes, 1988) in the human population of the Popular Republic of Mozambique. **Rev. Cub. Cienc. Vet.**, 15, pp 41-50
- Rodriguez R. I., Trees A. J. (1996): In vitro responsiveness of *Babesia bovis* to imidocarb dipropionate and the selection of a drug-adapted line. **Vet. Parasitol.**, 62: 35–41.
- Rosa P. (2005): Lyme disease agent borrows a practical coat. **Nat. Med.**, 11: 831–832.
- Rosa P. A., Schwan T. G. (1989): A specific and sensitive assay for the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. **J. Infect. Dis.** 160: 1018–1029.
- Rosa P. A., Tilly K., Stewart P. E. (2005): The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. **Nat. Rev. Microbiol.**, 3: 129–143.
- Rosef O., Paulauskas A., Radzijeuskaja J. (2009): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in questing Ixodes ricinus ticks in relation to the density of wild cervids. **Acta. Vet. Scand.**, 51: 47.
- Roseblatt-Binn H., Klein A., Sredni B. (1996): Antibabesial effect of immunomodulator AS101 in mice: role of increased production of nitric oxid. **Parasitol. Immunol.**, 18: 297-306.
- Rosenberg Y.J., Evans C.B. (1979): Resistance of mice suppressed for IgM production to *Babesia microti* infection. **Nature**, 281: 302-304
- Rosner F., Zarrabi M. H., Benach J. L., Habicht G. S. (1984): Babesiosis in splenectomized adults. Review of 22 reported cases. **Am. J. Med.**, 4: 696–701.
- Roulston, W. J., Stone, B. F., Wilson, J. T., White, L. I. (1968). Chemical control of an organophosphorus- and carbamate-resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) from Queensland. **Bull. Entomol. Res.**, 58: 379–392.
- Roux V., Raoult D. (1999): Phylogenetic analysis and taxonomic relationships among the genus *Rickettsia*. In ***Rickettsiae and Rickettsial Diseases at the Turn of the Third Millennium***. Edited by D. Raoult & P. Brouqui. Paris: Elsevier: 52-66.
- Roy-Smith F. (1975): Amitraz: Australian field trials against the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Proceedings of the 8th British Insecticide and Fungicide Conference*, pp. 565–571.
- Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., Oliver JH Jr. (2011): Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. **Ticks Tick Borne Dis.**, 2(3):123-128.
- Rudenko N., Golovchenko M., Mokracek A., Piskunova N., Ruzek D., Mallatova N., Grubhoffer L. (2008): Detection of *Borrelia bissettii* in cardiac valve tissue of a patient with endocarditis and aortic valve stenosis in the Czech Republic. **J. Clin. Microbiol.**, 46: 3540–3543.
- Rudenko N., Golovchenko M., Růžek D., Piskunova N., Mallatova N., Grubhoffer L. (2009a): Molecular detection of *Borrelia bissettii* DNA in serum samples from patients in the Czech Republic with suspected borreliosis. **FEMS Microbiol. Lett.**, 292: 274–281.
- Rudenko, N., Golovchenko M., Grubhoffer L., Oliver J. H. Jr. (2009b): *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the southeastern region of the United States. **J. Clin. Microbiol.**, 47: 134–141.
- Rudzinska M. A. (1976): Ultrastructure of intraerythrocytic *Babesia microti*, with emphasis on the feeding mechanism. **J. Protozool.**, 23: 224–233.
- Rudzinska M. A., Lewengrub S., Spielman A., Piesman J. (1983b): Invasion of *Babesia microti* into epithelial cells of the tick gut. **Journal of Protozoology**, 30: 338-346.
- Rudzinska M. A., Spielman A., Lewengrub S., Piesman J., Karakashian S. (1984): The sequence of developmental events of *Babesia microti* in the gut of *Ixodes dammini*. **Protistologica**, 20: 649-663.
- Rudzinska M. A., Spielman A., Lewengrub S., Trager W., Piesman J. (1983b): Sexuality in piroplasms as revealed by electron microscopy in *Babesia microti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 80: 2966–2970.
- Rudzinska M. A., Spielman A., Riek R. F., Lewengrub S. J., Piesman J. (1979): Intraerythrocytic “gametocytes” of *Babesia microti* and their maturation in ticks. **Can. J. Zool.**, 57: 424–434.

- Ruebush T. K., Cassaday P. B., Marsh H. J., Lisker S. A., Voorhaes D. B., Mahoney E. B., Healy G. R. (1977): Human Babesiosis on Nantucket Island: clinical features. **An. Intern. Med.**, 86: 6-9.
- Ruebush T. K., Hanson W. L. (1980): Thymus dependence of resistance to infection with *Babesia microti* of human origin in mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 29, pp 507-515
- Ruebush T. K., Piesman J., Collins W. E., Spielman A., Warren M. C. (1981a): Tick transmission of *Babesia microti* to rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **Am. J. Med. Hyg.**, 30: 555-559.
- Ruebush, T. K., Juranek D. D., Spielman A., Piesman J., Healy G. R. (1981b): Epidemiology of human babesiosis on Nantucket Island. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 30: 937-941.
- Rupprecht T. A., Kirschning C. J., Popp B., Kastenbauer S., Fingerle V., Pfister H. W., Koedel U. (2007): *Borrelia garinii* induces CXCL13 production in human monocytes through Toll-like receptor 2. **Infect. Immun.**, 75: 4351-4356.
- Rupprecht T. A., Koedel U., Fingerle V., Pfister H. W. (2008): The pathogenesis of lyme neuroborreliosis: from infection to inflammation. **Mol. Med.**, 14: 205-212.
- Rutter T. (1998): Lyme disease vaccine given guarded approval in the US. **BMJ**, 316: 1695.
- Ryffel K., Peter O., Rutti B., Suard A., Dayer E. (1999): Scored antibody reactivity determined by immunoblotting shows an association between clinical manifestations and presence of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, and *B. valaisiana* in humans. **J. Clin. Microbiol.**, 37: 4086-4092.
- Sackett D. L., Haynes R. B., Tugwell P. (1985): Clinical epidemiology: a basic science for clinical medicine (1st ed.), Little Brown, Boston, MA.
- Sager H., Davis W. C., Dobbelaere D. A., Jungi T. W. (1997): Macrophage-parasite relationship in theileriosis. Reversible phenotypic and functional dedifferentiation of macrophages infected with *Theileria annulata*. **J. Leukoc. Biol.**, 61: 459-468.
- Saint Giron, I., Gern L., Gray J. S., Guy E. C., Korenberg E., Nuttall P. A., Rijpkema S. G., Schonberg A., Stanek G., Postic D. (1998): Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe. **Zentbl. Bakteriologie**, 287: 190-195.
- Saito K., Ito T., Asashima N., Ohno M., Nagai R., Fujita H., Koizumi N., Takano A., Watanabe H., Kawabata H. (2007): Case report: *Borrelia valaisiana* infection in a Japanese man associated with traveling to foreign countries. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 77: 1124-1127.
- Saitou N., Nei M. (1987): The neighbour-joining: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, 4: 406-425.
- Salazar J. C., Pope C. D., Sellati T. J., Feder H. M. Jr, Kiely T. G., Dardick K. R., Buckman R. L., Moore M. W., Caimano M. J., Pope J. G., Krause P. J., Radolf J. D., Lyme Disease Network (2003): Coevolution of markers of innate and adaptive immunity in skin and peripheral blood of patients with erythema migrans. **J. Immunol.**, 171: 2660-2670.
- Samish M., Ginsberg H., Glazer I. (2004): Biological control of ticks. **Parasitology**, 129: 389-403.
- Samish M., Glazer I. (2001): Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. **Trends in Parasitology**, 17: 368-371.
- Santino I, Iori A, Sessa R, Sulli C, Favia G, Del Piano M. (1998): *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Ehrlichia chaffeensis* in the National Park of Abruzzo. **FEMS Microbiol. Lett.**, 164(1): 1-6.
- Santino I., Berlutti F., Pantanella F., Sessa R., del Piano M. (2008): Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA by PCR in serum of patients with clinical symptoms of Lyme borreliosis. **FEMS Microbiol. Lett.**, 283: 30-35.
- Santino I., Cammarata E., Franco S., Galdiero F., Oliva B., Sessa R., Cipriani P., Tempera G., Del Piano M. (2004): Multicentric study of seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophila* in high-risk groups in regions of central and southern Italy. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.**, 17(2): 219-223.
- Santos A. S., Alexandre N., Sousa R., Nuncio M. S., Bacellar F., Dumler J. S. (2009): Serological and molecular survey of Anaplasma species infection in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. **Vet Rec.**, 164:168-171.



## Bibliografia

- Santos A. S., Santos-Silva M. M., Almeida V. C., Bacellar F., Dumler J. S. (2004): Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in *Ixodes* ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Setubal District, mainland Portugal. **Emerg. Infect. Dis.**, 10: 1643–1648.
- Savić S., Vidić B., Lazić S., Lako B., Potkonjak A., Lepšanović Z. (2010): *Borrelia burgdorferi* in ticks and dogs in the province of Vojvodina, Serbia. **Parasite.**, 17(4): 357–361.
- Savini G., Onuma M., Scaramozzino P., Kakuda T., Semproni G., Langella V. (1998): First report of *Theileria* *sergenti* and *T. buffeli/orientalis* in cattle in Italy. **Ann N Y Acad Sci.**, 849: 404–407.
- Schaarschmidt-Kiener D., Graf F., von Loewenich FD, Müller W. (2009): *Anaplasma phagocytophilum* infection in a cat in Switzerland. **Schweiz Arch Tierheilkd**, 151: 336–341.
- Schein E., Rehbein G., Voigt W. P., Zweggarth E. (1981): *Babesia equi* (Laveran 1901) 1. Development in horses and in lymphocyte culture. **Tropenmed. Parasitol.**, 32: 223–227.
- Schetters T. (2005): Vaccination against canine babesiosis. **Trends Parasitol.**, 21: 179–184.
- Schetters T. P., Moubri K., Cooke B. M. (2009): Comparison of *Babesia rossi* and *Babesia canis* isolates with emphasis on effects of vaccination with soluble parasite antigens: a review. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, 80: 75–78.
- Schlesinger P. A., Duray P. H., Burke B. A., Steere A. C., Stillman M. T. (1985): Maternal-fetal transmission of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. **Ann. Intern. Med.**, 103: 67–8.
- Schmidli J., Hunziker T., Moesli P., Schaad U. B. (1988): Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from joint fluid three months after treatment of facial palsy due to Lyme borreliosis. **J. Infect. Dis.**, 158: 905–906.
- Schmidt B. L. (1997): PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, 10: 185–201.
- Schoeler G. B., Lane R. S. (1993): Efficiency of transovarial transmission of the Lyme Disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in the Western blacklegged tick, *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, 1: 80–86.
- Scholtens R. G., Braff E. H., Healy G. R., Gleason N. N. (1968): A case of babesiosis in a man in the United States. **Am. J. Trop. Hyg.**, 17: 810–813.
- Schuntner, C. A., Schnitzerling, H. J., Roulston, W. J. (1971): Carbaryl metabolism in larvae of organophosphorus and carbamate-susceptible and -resistant strains of cattle tick *Boophilus microplus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 1: 424–433.
- Schuster F. L. (2002): Cultivation of *Babesia* and *Babesia-like* blood parasites: agents of an emergent zoonotic disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, July: 365–373.
- Schutzer S. E., Brown T. Jr, Holland B. K. (1997a): Reduction of Lyme disease exposure by recognition and avoidance of high-risk areas. **Lancet**, 349: 1668.
- Schutzer S. E., Coyle P. K., Dunn J. J., Luft B. J., Brunner M. (1994): Early and specific antibody response to OspA in Lyme disease. **J. Clin. Invest.**, 94: 454–457.
- Schutzer S. E., Coyle P. K., Krupp L. B., Deng Z., Belman A. L., Dattwyler R., Luft B. J. (1997b): Simultaneous expression of *Borrelia* OspA and OspC and IgM response in cerebrospinal fluid in early neurologic Lyme disease. **J. Clin. Invest.**, 100: 763–767.
- Schutzer S. E., Coyle P. K., Reid P., Holland B. (1999): *Borrelia burgdorferi*-specific immune complexes in acute Lyme disease. **JAMA**, 282: 1942–1946.
- Schutzer S. E., Holland B. K., Brown T. Jr. (1998): Avoidance of tick-borne diseases. **Ann. Intern. Med.**, 128: 784.
- Schutzer S. E., Luan J. (2003): Early OspA immune complex formation in animal models of Lyme disease. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, 5: 167–171.
- Schutzer S. E., Luan J., Coyle P. K. (1997c): Detection of Lyme disease after OspA vaccine. **N. Engl. J. Med.**, 337: 794–795.
- Schwabe C. W., Reimann H. P., Franti C. E. (1986): **Epidemiologia veterinaria**. Ed Agricole, pp 13–16.
- Schwan T. G. (1996): Ticks and *Borrelia*: model systems for investigating pathogen-arthropod interactions. **Infect. Agents Dis.**, 5: 167–181.

- Schwan T. G., Piesman J. (2002): Vector interactions and molecular adaptations of Lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. **Emerg. Infect. Dis.**, 8: 115–121.
- Schwan T. G., Piesman J., Golde W. T., Dolan M. C., Rosa P. A. (1995): Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92: 2909-2913.
- Schwarz A., Maier W.A., Kistemann T., Kampen H. (2009): Analysis of the distribution of the tick *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae) in a nature reserve of western Germany using Geographic Information systems. **Int. J. Environ. Health**, 212: 87-96.
- Scorpio D. G., Akkoyunlu M., Fikrig E., Dumler J. S. (2004): CXCR2 blockade influences *Anaplasma phagocytophilum* propagation but not histopathology in the mouse model of human granulocytic ehrlichiosis. **Clin Diagn Lab Immunol.**, 11: 963–968.
- Scott J. D., Lee M. K., Fernando K., Jorgensen D. R., Durden L. A., Morshed M. G. (2008): Rapid introduction of Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) established at Turkey Point Provincial Park, Ontario, Canada. **J. Vector. Ecol.**, 33: 64-69.
- Semenza J. C., Menne B. (2009): Climate change and infectious diseases in Europe. **Lancet Infect Dis.**, 9(6): 365-375.
- Sen E., Uchishima Y., Okamoto Y., Fukui T., Kadosaka T., Ohashi N., Masuzawa T. (2011): Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks from Istanbul metropolitan area and rural Trakya (Thrace) region of north-western Turkey. **Ticks Tick Borne Dis.**, 2: 94-98.
- Serbina N. V., Jia T., Hohl T. M., Pamer E. G. (2008): Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. **Annu. Rev. Immunol.**, 26: 421-452.
- Sergeant E., Donatien A., Parrot L., Lestoquart F., Plantureux E. (1926): Les piroplasmoses bovines dues aux Babesiella etude d'ensemble avec description d'une espee nouvelle, B. major, originaire de France. **Arch. Inst. Pasteur Alger**, 4: 318.
- Shapiro E. D., Gerber M. A. (2000): Lyme disease. **Clin. Infect. Dis.**, 31: 533-542.
- Shaw M. K. (1997): The same but different: the biology of *Theileria* sporozoite entry into bovine cells. **International Journal for Parasitology**, 27: 457-474.
- Shaw M. K. (2003): Cell invasion by *Theileria* sporozoites. **Trends Parasitol.**, 19(1): 2-6.
- Shaw M. K., Tinley L. G. (1992): How individual cells develop from a syncytium: merogony in *Theileria parva* (Apicomplexa). **Journal of Cell Science**, 101: 109-123.
- Shaw M. K., Tinley L. G., McKeever D. J. (1993): Tick salivary gland extract and Interleukin-2 stimulation enhance susceptibility of lymphocytes to infection by *Theileria parva* sporozoites. **Infection and Immunity**, 61: 1486-1495.
- Shaw M. K., Tinley L. G., Musoke A. J. (1991): The entry of *Theileria parva* sporozoites into bovine lymphocytes: evidence for MHC Class I involvement. **Journal of Cell Biology**, 113: 87-101.
- Shaw M. K., Young A. S. (1994): The biology of *Theileria* species in ixodid ticks in relation to parasite transmission. **Advances in Disease Vector Research**, 10: 23-63.
- Shaw R. D. (1969). Tick control on domestic animals. I. A brief history of the economic significance of tick infestations. **Trop. Sci.**, 11: 113–119.
- Shaw R. D., (1970): Tick control on domestic animals. II. The effect of modern treatment methods. **Trop. Sci.**, 12: 29–36.
- Shaw S. E., Irwin P. (2001): Le conseguenze dell'infestazione del cane e del gatto. **Waltham Focus**, 11 (2): 16-22.
- Shaw S., Kenny M., Day M., Birtles R. (2001): Equine granulocytic ehrlichiosis in the UK. **Vet. Rec.**, 149: 127–128.
- Shih C. M., Lui L. P., Chung W. C., Ong S. J., Wang C. C. (1997): Human babesiosis in Taiwan: asymptomatic infection with a *Babesia microti*-like organism in a Taiwanese woman. **J. Clin. Microbiol.**, 35: 450-454.
- Shkap V., Pipano E. (2000): Culture-derived vaccination of cattle against tick-borne

- diseases. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 916: 154-171.
- Shortt H. E. (1962): Ticks and piroplasms, no.6. In Arthur D. R. (ED), Aspects of disease transmission by ticks. Zoological society of London, London, United Kingdom.
  - Shpynov S., Fournier P. E., Rudakov N., Tarasevich I. e Raoult D. (2006): Detection of members of the genera *Rickettsia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* in ticks collected in the Asiatic part of Russia. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1078: 378–383.
  - Shukla S. K., Aswani V., Stockwell P. J., Reed K. D. (2007): Contribution of polymorphisms in ankA, gltA, and groESL in defining genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*. **J Clin Microbiol.**, 45: 2312-2315.
  - Sigal L. H., Williams S. (1997): A monoclonal antibody to *Borrelia burgdorferi* flagellin modifies neuroblastoma cell neuritogenesis in vitro: a possible role for autoimmunity in the neuropathy of Lyme disease. **Infect. Immun.**, 65: 1722-1728.
  - Silaghi C., Hamel D., Thiel C., Pfister K., Friche Passos L. M., Rehbein S. (2011a): Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in wild caprine and cervid ungulates from the Alps in Tyrol, Austria. **Vector-borne Zoon. Dis.**, 3: 1-8.
  - Silaghi C., Kauffmann M., Passos L. M., Pfister K., Zweygarth E. (2011b): Isolation, propagation and preliminary characterisation of *Anaplasma phagocytophilum* from roe deer (*Capreolus capreolus*) in the tick cell line IDE8. **Ticks Tick Borne Dis.**, 2: 204-208.
  - Silaghi C., Liebisch G., Pfister K. (2011c): Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases. **Parasit Vectors.** 4: 161.
  - Simic C. P., Petrovic S., Rakovec R. (1955): Les especes de Babesiella du Bœuf d'Europe. **Arch. Inst. Pasteur Alger.** 33: 310.
  - Sinski E., Gill J., Rijpkema S. (1996): Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in European bison (*Bison bonasus*) from Bialowieza Primeval Forest. **Rocz. Akad. Med. Białymst.**, 41: 111-116.
  - Sirigireddy K. R., Ganta R. R. (2005): Multiplex detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* species pathogens in peripheral blood by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J. Mol. Diagn.**, 7: 308-316.
  - Skarphedinsson S., Sogaard P., Pedersen C. (2001): Seroprevalence of human granulocytic ehrlichiosis in highrisk groups in Denmark. **Scand J Infect Dis.**, 33: 206–210.
  - Skotarczak B, Cichocka A. (2001): The occurrence DNA of *Babesia microti* in ticks *Ixodes ricinus* in the forest areas of Szczecin. *Folia Biol (Krakow)*, 49(3-4): 247-250.
  - Skotarczak B, Wodecka B, Cichocka A. (2002): Coexistence DNA of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from north-western Poland. **Ann Agric Environ Med.**, 9(1): 25-28.
  - Skotarczak B. (2002): Canine borreliosis--epidemiology and diagnostics. **Ann Agric Environ Med.**, 9(2): 137-40.
  - Skotarczak B., Adamska M., Rymaszewska A., Suproń M., Sawczuk M., Maciejewska A. (2004): *Anaplasma phagocytophila* and protozoans of *Babesia* genus in dogs from endemic areas of Lyme disease in north-western Poland. **Wiad Parazytol.**, 50: 555–561.
  - Skrabalo Z., Deanovic Z. (1957): Piroplasmosis in man: report of a case. **Doc. Med. Geogr. Trop.**, 9: 11–16.
  - Smith R. D., Evans D. E., Martins J. R., Ceresér V. H., Correa B. L., Petraccia C., Cardozo H., Solari M. A., Nari A. (2000): Babesiosis (*Babesia bovis*) stability in unstable environments. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 916: 510–520.
  - Smith R. P., Evans A. T., Popowsky M., Mills L., Spielman A. (1986): Transfusion-acquired babesiosis and failure of antibiotic treatment. **JAMA**, 256: 2726–2727.
  - Smith R. P., Schoen R. T., Rahn D. W., Sikand V. K., Nowakowski J., Parenti D. L., Holman M. S., Persing D. H., Steere A. C. (2002): Clinical characteristics and treatment outcome of early Lyme disease in patients with microbiologically confirmed erythema migrans. **Ann. Intern. Med.**, 136: 421-428.
  - Smith R., Takikinen J. (2006): Editorial team. Lyme borreliosis: Europewide coordinated surveillance and action needed? *Euro Surveill*, 11(25):pii=2977. Available from:

- <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2977>
- Smith T., Kilbourne F.L. (1893): Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or southern cattle fever. **Bur. Anim. Ind. Bull.**, 1: 151-152.
  - Sodikoff C. H. (1997): Medicina di laboratorio del cane e del gatto. Masson edizioni Veterinarie, Cremona, 1997, pp. 254-255.
  - Solano-Gallego L., Baneth G. (2011): Babesiosis in dogs and cats. Expanding parasitological and clinical spectra. **Vet. Par.**, 181: 48-60.
  - Solano-Gallego L., Lull J., Osso M., Hegarty B., Breitschwerdt E. (2006): A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. **Vet Res.**, 37: 231-244.
  - Solano-Gallego L., Trotta M., Carli E., Carcy B., Caldin M., Furlanello T., (2008): *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. **Vet. Parasitol.**, 157: 211-221.
  - Solomon J. B., Forbes M. G., Solomon J. R. (1985): A possible role of natural killer cells in providing protection against *Plasmodium berghei*. IN: Early stage of infection. **Immuno. Lett.**, 9: 349-353.
  - Sonenshine D. E. (1991): Biology of tick. Vol. I. Oxford University Press, New York, USA.
  - Sonenshine D. E. (1993): Biology of tick. Vol. II. Oxford University Press, UK, pp. 320-400.
  - Sonenshine D. E. (1994): Host specificity and host utilization. In: Sonenshine D.E., Mather TM. (Eds.) Ecological dynamics of tick borne zoonoses. Oxford university press, New York, 1994, pp. 7-9.
  - Sonenshine D. E. (2005): The biology of tick vectors of human disease. In: Goodman J.L., Dennis D.T., Sonenshine D.E. (Eds.) Tick-Borne Diseases of Humans. ASM Press, Washington, 2005.
  - Sonenshine D. E. (2008): Pheromones and other semiochemicals of ticks and their use in tick control. In: Bowman A.S., Nuttall P.A. (Eds.) Ticks. Biology, Disease and Control. Cambridge University Press, pp.470-491.
  - Sonenshine D. E., Adams T., Allan S. A., McLaughlin J., Webster F. X. (2003): Chemical composition of some components of the arrestment pheromone of the black-legged tick, *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) and their use in tick control. **J. Med. Entomol.**, 40: 849-859.
  - Sonenshine D. E., Kocan K., de la Fuente J. (2006): Tick control: further thoughts on a research agenda. **Trends in Parasitology**, 22: 550-551.
  - Soulsby E. J. L. (1982): Helminths, Arthropods and Protozoa of domestic animals, Seventh Edition. Balliere Tindall; London.
  - Speck S., Failing K., Reiner B., Wittenbrink M. M. (2002): Evaluation of different media and a BGM cell culture assay for isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from ticks and dogs. **Vet. Microbiol.**, 89: 291-302.
  - Spencer J. A., Butler J. M., Stafford K. C., Pough M. B., Levy S. A., Bledsoe D. L., Blagburn B. L. (2003): Evaluation of permethrin and imidacloprid for prevention of *Borrelia burgdorferi* transmission from blacklegged ticks (*Ixodes scapularis*) to *Borrelia burgdorferi*-free dogs. **Parasitol. Res.**, 90: 106-107.
  - Spickett A. M. (1992): Sweating sickness-aetiology and the development of immunity. In: Munderloh U.G., Kurtti T.J. (Eds.) First international conference on tick-borne pathogens at the host-vector interface: an agenda for research. St. Paul, Minnesota, USA, 1992.
  - Spickett A. M., Elliott E. G. R., Heyne H., Neser J. A. (1989): Paralysis of laboratory rabbits by nymphs of *Ixodes rubicundus* and some effects on the life-cycle following feeding under different temperature conditions. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, 56: 59-62.
  - Spielman A. (1976): Human babesiosis on Nantucket Island: transmission by nymphal Ixodes ticks. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 25: 784-787.
  - Spielman A., Clifford C. M., Piesman J., Corwin M. D. (1979): Human babesiosis on Nantucket Island, USA: description of the vector, Ixodes (Ixodes) dammini, n. sp. (Acarina: Ixodidae). **J.**

- Med. Entomol.**, 15: 218–234.
- Spielman A., Wilson M. L., Levine J. F., Piesman J. (1985): Ecology of *Ixodes dammini*-borne human babesiosis and Lyme disease. **Annu. Rev. Entomol.**, 30: 439–460.
  - Spielman, A., Etkind P., Piesman J., Ruebush II T. K., Juranek D. D., Jacobs M. S. (1981): Reservoir hosts of human babesiosis on Nantucket Island. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 30: 560–565.
  - Spooner R. L., Innes E. A., Glass E. J., Brown C. G. (1989): *Theileria annulata* and *T. parva* infect and transform different bovine mononuclear cells. **Immunology**, 66: 284–288
  - Stafford III K. C. (2007): Tick Management Handbook: An Integrated Guide for Homeowners, Pest Control Operators, and Public Health Officials for the Prevention of Tick-Associated Disease. **The Connecticut Agricultural Experimental Station**, New Haven, Conn, USA.
  - Stafford K. C. III, Denicola A. J., Kilpatrick H. J. (2003): Reduced abundance of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) and the tick parasitoid *Ixodiphagus hookeri* (Hymenoptera: Encyrtidae) with reduction of white-tailed deer. **J. Med. Entomol.**, 40: 642–52.
  - Stafford K. C. III, Ward J. S., Magnarelli L. A. (1998): Impact of controller burns on the abundance of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, 35: 510–513.
  - Standaert S. M., Dawson J. E., Schaffner W., Childs J. E., Biggie K. L., Singleton J. Jr, Gerhardt R. R., Knight M. L., Hutcheson R. H. (1995): Ehrlichiosis in a golf-oriented retirement community. **N Engl J Med.**, 333:420–425.
  - Stanek G. (2009): Pandora's Box: pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in Central Europe. **Wien Klin Wochenschr.** 121: 673–683.
  - Stanek G., Klein J., Bittner R., Glogar D.. (1990): Isolation of *Borrelia burgdorferi* from the myocardium of a patient with longstanding cardiomyopathy. **N. Engl. J. Med.**, 322: 249–252.
  - Stanek G., Reiter M. (2011): The expanding Lyme *Borrelia* complex– clinical significance of genomic species? **Clin. Microbiol. Infect.**, 17(4): 487–493.
  - Stanek G., Strle F. (2003): Lyme borreliosis. **Lancet**, 362: 1639–1647.
  - Stanek, G., O'Connell S., Cimmino M., Aberer E., Kristoferitsch W., Granstrom M., Guy E., Gray J. (1996): European union concerted action on risk assessment in Lyme borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis. **Wien. Klin. Wochenschr.** 108: 741–747.
  - Stanford G. D., Baker J. A. F., Ratley C. V., Taylor, R. J. (1981). The development of a stabilized amitraz cattle dip for control of single and multi-host ticks and their resistant strains in South Africa. In *Proceedings of a Conference on Tick Biology and Control*, eds. Whitehead, G. B. & Gibson, J. D., Rhodes University, Grahamstown, South Africa, pp. 143–181.
  - Starcovici C. (1893): Bemerkungen uber den durch Babes entdeckten Blood parasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krankheiten, die seuchenhafte Hamoglobinurie des Rindes (Babes), das Texas fieber (Th. Smith) und der carceag der Schafe (Babes), **Zentralbl. Bakteriol. Parasiten kd. Infektionskr.** Abt. 1,14
  - Starkoff O. (1962): Nuove osservazioni faunistiche e biologiche sulle zecche italiane. **Parassitologia**, 4: 31–37.
  - Steere A. C. (1989): Lyme disease. **N. Engl. J. Med.**, 321:586–596. Citato da Bhate C., Schwartz R. A., 2011.
  - Steere A. C. (2001): Lyme disease. **N. Engl. J. Med.** 345: 115–125.
  - Steere A. C. (2006): Lyme borreliosis in 2005, 30 years after initial observations in Lyme, Connecticut. **Wien Klin. Wochenschr.**, 118: 625–633.
  - Steere A. C., Angelis S. M. (2006): Therapy for Lyme arthritis: strategies for the treatment of antibiotic-refractory arthritis. **Arthritis Rheum.**, 54: 3079–3086.
  - Steere A. C., Bartenhagen N. H., Craft J. E., Hutchinson G. J., Newman J. H., Rahn D. W., Sigal L. H., Spieler P. N., Stenn K. S., Malawista S. E. (1983): The early clinical manifestations of Lyme disease. **Ann. Intern. Med.**, 99: 76–82.
  - Steere A. C., Coburn J., Glickstein L. (2004): The emergence of Lyme disease. **J. Clin. Invest.**, 113: 1093–1101.
  - Steere A. C., Glickstein L. (2004): Elucidation of Lyme arthritis. **Nat. Rev. Immunol.**, 4: 143–152.

- Steere A. C., Grodzicki R. L., Kornblatt A. N., Craft J. E., Barbour A. G., Burgdorfer W., Schmid G. P., Johnson E., Malawista S. E. (1983): The spirochetal etiology of Lyme disease. **N. Engl. J. Med.**, 308: 733–740. Citato da Bhate C., Schwartz R. A., 2011a.
- Steere A. C., Gross D., Meyer A. L., Huber B. T. (2001): Autoimmune mechanisms in antibiotic treatment-resistant Lyme arthritis. **J. Autoimmun.**, 16: 263-268.
- Steere A. C., Klitz W., Drouin E. E., Falk B. A., Kwok W. W., Nepom G. T., Baxter-Lowe L. A. (2006): Antibiotic-refractory Lyme arthritis is associated with HLA-DR molecules that bind a *Borrelia burgdorferi* peptide. **J. Exp. Med.**, 203: 961–971.
- Steere A. C., Malawista S. E., Hardin J. A., Ruddy S., Askenase W., Andiman W. A. (1977a): Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. **Ann. Intern. Med.**, 86: 685-698.
- Steere A. C., Malawista S. E., Newman J. H., Spieler P. N., Bartenhagen N. H. (1980): Antibiotic therapy in Lyme disease. **Ann. Intern. Med.**, 93: 1-8.
- Steere A. C., Malawista S. E., Snyderman D. R., Shope R. E., Andiman W. A., Ross M. R., et al. (1977b): Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. **Arthritis Rheum.**, 20: 7-17. Citato da Shapiro e Gerber, 2000.
- Steere A. C., Schoen R. T., Taylor E. (1987): The clinical evolution of Lyme arthritis. **Ann. Intern. Med.**, 107: 725-731.
- Stefanciková A., Adaszek Ł., Pet'ko B., Winiarczyk S., Dudinák V. (2008): Serological evidence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in horses and cattle from Poland and diagnostic problems of Lyme borreliosis. **Ann Agric Environ. Med.**, 15(1): 37-43.
- Stefanciková A., Derdákova M., Škardová I., Szešćáková E., Cisláková L., Kováčová D., Stanko M., Petko B. (2000): Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in horses of east Slovakia. **Vet. Med. Czech.**, 45: 227-231. Citato da Hansen e coll. (2010).
- Stefancikova A., Skardova I., Pet'ko B., Janovska D., Cyprichova V. (1996): IgG antibodies to *Borrelia* in dogs in the area of Kosice. **Vet Med (Praha)**, 41: 83-86 (in Slovak). Citato da Skotarczak, 2002.
- Steketee R. W., Eckman M. R., Burgess E. C. (1985): babesiosis in Wisconsin: a new focus of disease transmission. **J. Am. Med. Assn.**, 253: 2675-2678.
- Stella E., Khoury C., D'Amato FR., Rivošecchi L. (1988): Nuovi dati sulla biologia di *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodidae) nella periferia di Roma. **Rivista Parassitologica**, 49: 3-13.
- Steuber S., Frevert U., Ahmed J. S., Hauschild S., Schein E. (1986): *In vitro* susceptibility of different mammalian lymphocytes to sporozoites of *Theileria annulata*. **Z. Parasitenkd.**, 72: 831–834.
- Steullet P. (1993): Perception of vertebrate volatiles in the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum* Fabricius. Ph.D. Thesis, University of Neuchatel, Switzerland.
- Straubinger R. K., Rao T. D., Davidson E., Summers B. A., Jacobson R. H., Frey A. B. (2002): Protection against tick-transmitted Lyme disease in dogs vaccinated with a multiantigenic vaccine. **Vaccine**, 20: 181-193.
- Straubinger R. K., Straubinger A. F., Härter L., Jacobson R. H., Chang Y. F., Summers B. A., Erb H. N., Appel M. J. (1997): *Borrelia burgdorferi* migrates into joint capsules and causes an up-regulation of interleukin-8 in synovial membranes of dogs experimentally infected with ticks. **Infect. Immun.**, 65: 1273-1285.
- Straubinger R. K., Straubinger A. F., Summers B. A., Jacobson R. H., Erb H. N. (1998) Clinical manifestations, pathogenesis, and effect of antibiotic treatment on Lyme borreliosis in dogs. **Wien. Klin. Wochenschr.**, 110: 874-881.
- Straubinger R. K., Straubinger A. F., Summers B. A., Jacobson R. H. (2000): Status of *Borrelia burgdorferi* infection after antibiotic treatment and the effects of corticosteroids: an experimental study. **J Infect Dis.**, 181: 1069-1081.
- Strik N., Alleman A. R., Barbet A. F., Sorenson H. L., Wamsley H. L., Gaschen F. P., Luckschander N., Wong S., Chu F., Foley J. E., Bjoersdorff A., Stuenkel S., Knowles D. P. (2007): Characterization of major surface protein 5 of *Anaplasma phagocytophilum* and the

- extent of cross-reactivity with *A. marginale*. **Clin Vaccine Immunol.**, 14: 262–268.
- Strle F., Nadelman R. B., Cimperman J., Nowakowski J., Picken R. N., Schwartz I., Maraspin V., Aguero-Rosenfeld M. E., Varde S., Lotric-Furlan S., Wormser G. P. (1999): Comparison of culture-confirmed erythema migrans caused by *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in New York State and by *Borrelia afzelii* in Slovenia. **Ann. Intern. Med.**, 130: 32–36.
  - Strle F., Nelson J. A., Ruzic-Sabljic E., Cimperman J., Maraspin V., Lotric-Furlan S., Cheng Y., Picken M. M., Trenholme G. M., Picken R. N. (1996): European Lyme borreliosis: 231 culture-confirmed cases involving patients with erythema migrans. **Clin. Infect. Dis.**, 23: 61–65.
  - Strle F., Picken R. N., Cheng Y., Cimperman J., Maraspin V., Lotrič-Furlan S., Ružić-Sabljic E., Picken M. M. (1997): Clinical findings for patients with Lyme borreliosis caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities to strain 25015. **Clin. Infect. Dis.**, 25: 273–280.
  - Strle K., Drouin E. E., Shen S., Khoury J. E., McHugh G., Ruzic-Sabljic E., Strle F., Steere A. C. (2009): *Borrelia burgdorferi* stimulates macrophages to secrete higher levels of cytokines and chemokines than *Borrelia afzelii* or *Borrelia garinii*. **J. Infect. Dis.**, 200: 1936–1943.
  - Stubbs V. K., Wilshire C., Webber, G. (1982). Cyhalothrin: a novel acaricidal and insecticidal synthetic pyrethroid for the control of the cattle tick (*Boophilus microplus*) and the buffalo fly (*Haematobia irritans exigua*). **Australian Vet. J.**, 59: 152–155.
  - Stuen S., Bergström K., Petrovec M., Van de Pol I., Schouls L. M. (2003): Differences in clinical manifestations and hematological and serological responses after experimental infection with genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in sheep. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, 10: 692–695.
  - Stuen S., Engvall E. O., Van de Pol I., Schoouls L. M. (2001): Granulocytic ehrlichiosis in a roe deer calf in Norway. **J. Wildlife Dis.**, 37: 614–616.
  - Stuen S., Moum T., Bernhoft A., Vene S. (2006a): A paretic condition in an *Anaplasma phagocytophilum* infected roe deer calf. **J. Wildl. Dis.**, 42: 170–174.
  - Stuen S., Moum T., Petrovec M., Schouls L. M., (2006b): Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in Norway. **Int. J. Med. Microbiol.**, 296: 164–166.
  - Stuen S., Van De Pol I., Bergström K., Schouls L. M. (2002): Identification of *Anaplasma phagocytophila* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) variants in blood from sheep in Norway. **J. Clin. Microbiol.**, 40: 3192–3197.
  - Suarez C. E., Noh S. (2011): Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. **Vet. Parasitol.**, 4: 109–125.
  - Suen S. (2007): *Anaplasma phagocytophilum* - the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. **Vet. Res. Commun.**, 31 Suppl 1: 79–84.
  - Sukumaran B., Narasimhan .S, Anderson J. F., DePonte K., Marcantonio N., Krishnan M. N., Fish D., Telford S. R., Kantor F. S., Fikrig E. (2006): An Ixodes scapularis protein required for survival of *Anaplasma phagocytophilum* in tick salivary glands. **J. Exp Med.**, 203(6): 1507–1517.
  - Suliman T., Abdoun A., El Tayeb M. (1998): *Babesia* parasites described from patients bled for malaria. **Saudi. Med. J.**, 19: 179–181.
  - Sumner J. W., Nicholson W. L., Massung R. F. (1997): PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock operon of *Ehrlichia* species. **J Clin Microbiol.**, 35: 2087–2092.
  - Sumption K. J., Wright D. J. M., Cutler S. J., Dale B. A. S. (1995): Human Ehrlichiosis in the UK. **Lancet**, 346: 1487–1488.
  - Sun T., Tenenbaum M. J., Greenspan J., Teichberg S., Wang R. T., Degnan T., Kaplan M. H. (1983): Morphologic and clinical observations in human infection with *Babesia microti*. **J. Infect. Dis.**, 148: 239–248.
  - Sun W., Ijdo J. W., Telford S. R., Hodzic E., Zhang Y., Barthold S. W., Fikrig E. (1997): Immunization against the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a murine model. **J Clin Invest.**, 100: 3014–3018.
  - Swanson S. J., Neitzel D., Reed K. D., Belongia E. A. (2006): Coinfections acquired from

- ixodes ticks. **Clin. Microbiol. Rev.**, 19: 708-727.
- Szabò M. P. J., Bechara G. H. (1995): An insight into the histopathology caused by the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acarina: Ixodidae), in the skin of previously infested, vaccinated or tick-bite naïve dogs, guinea pigs and hamsters. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, 32: 37-42.
  - Szczepanski A., Benach J. L. (1991): Lyme borreliosis: host responses to *Borrelia burgdorferi*. **Microbiol. Rev.** 55: 21-34.
  - Takada N., Masuzawa T., Ishiguro F., Fujita H., Kudaken M., Mitani H., Fukunaga M., Tsuchiya K., Yano Y., Ma X. H. (2001): Lyme disease *Borrelia* spp. in ticks and rodents from northwestern China. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67: 5161-5165.
  - Takken W., Knols B. G. J. (Ed.) *Emerging pests and vector borne diseases in Europe*. Wageningen (NL): Wageningen Academic Publishers; 2007. 500 p. Citato da Romi R. 2010.
  - Tampieri M. P., Galuppi R., Bonoli C., Cancrini G., Moretti A., Pietrobelli M. (2008): Wild ungulates as *Babesia* hosts in Northern and Central Italy. **Vector-Borne Zoon. Dis.**, 8 (5): 667-674.
  - Taylor S. M., Kenny J., Mallon T. (1983): The effect of multiple rapid passage on strains of ***Babesia divergens***: a comparison of the clinical effects on juvenile and adult cattle of passaged and irradiated parasites. **J. Comp. Pathol.**, 93: 391-396.
  - Teglás M. B., Foley J. (2006): Differences in transmissibility of two *Anaplasma phagocytophilum* strains by the North American tick specie *Ixodes pacificus* and *Ixodes scapularis*. **Exp. Appl. Acarol.**, 38: 47-58.
  - Teglás M., Matern E., Lein S., Foley P., Mahan S. M., Foley J. (2005): Ticks and tick-borne disease in Guatemala cattle and horses. **Vet. Par.**, 131: 119-127.
  - Telford III S. R., Korenberg E. I., Goethert H. K., Kovalevskii U. V., Gorelova N. B., Spielman A. (2002): Detection of natural foci of babesiosis and granulocytic ehrlichioses in Russia. **Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.**, 6: 21-25.
  - Telford S. R. III, A. Gorenflot, P. Brasseur, and A. Spielman. (1993): Babesial infections in humans and wildlife. In J. P. Kreier (ed.), **Parasitic protozoa**, 2nd ed., vol. 5. Academic Press, San Diego, Calif., pp. 1-47.
  - Telford S. R. III, Dawson J. E., Katavolos P., Warner C. K., Kolbert C. P., Persing D.H. (1996): Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 93: 6209-6214.
  - Telford S. R. III, Spielman A. (1989): Proximal maturation stimuli of *Ixodes*-borne pathogens. **Am. Soc. Trop. Med. Hyg., Annual Meeting**, Honolulu, USA.
  - Telford S.R. III, Spielman A (1998): Babesiosis of Humans. In: Collier L., Balows A., Sussman M. e Kreier J.P. (Eds), *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial infections* 9<sup>th</sup> Ed., Edward Arnold, London, pp 349-359.
  - Telford, S.R. III (1988): Incompetence of deer as reservoirs of the Lyme disease spirochete. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 39: 105-109.
  - Tetzlaff C. L., Carlomagno M. A., McMurray D. N. (1988): Reduced dietary protein contend suppresses infection with *Babesia microti*. **Med. Microbial. Immunol.**, 177: 305-315.
  - Teutsch S. M., Etkind P., Burwell E. L., Sato K., Dana M. M., Fleishman P. R., Juranek D. D. (1980): Babesiosis in post-splenectomy hosts. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 29: 738-741.
  - Theiler A. (1905): Notes on piroplasmosis in the horse, mule and donkey. Rep. Gov. Vet. Bactriol. Transv. 1903-1904: 171 (citato da Ristic, 1988).
  - Theiler A. (1906): Further notes on piroplasmosis of the horse, mule and donkey. Rep. Gov. Vet. Bactriol. Transv. 1904-1905: 94 (citato da Ristic, 1988).
  - Thomas R. J., Dumler J. S., Carlyon J. A. (2009): Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.**, 7: 709-722.
  - Thomas V., Fikrig E. (2007): *Anaplasma phagocytophilum* specifically induces tyrosine phosphorylation of ROCK1 during infection. **Cell. Microbiol.**, 9: 1730-1737.
  - Thomford J. W., Conrad P. A., Boyce W. M., Holman P. J., Jessup D. A. (1993): Isolation and



- in vitro* cultivation of *Babesia* parasites from free-ranging desert bighorn sheep (*Ovis Canadensis nelsoni*) and mule deer (*Odocoileus hemionus*) in California. **J. Parasitol.**, 79: 77-84.
- Thomford J. W., Conrad P. A., Telford III S. R., Mathiesen D., Bowman B. H., Spielman A., Eberhard M.L., Herwaldt B. L., Quick R. E., Persing D. H. (1994): Cultivation and phylogenetic characterization of a newly recognized human pathogenic protozoan. **J. Infect. Dis.**, 169: 1050-1056.
  - Thompson R. C. A. (2001): The future of veterinary parasitology: a time for change? **Vet. Parasitol.**, 98: 41-50.
  - Thorshaug K. (1940): *Anaplasma phagocytophilum* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) infection in sheep and wild ruminants in Norway: a study on clinical manifestation, distribution and persistence. Doctor Philosophiae Thesis, Norwegian College of Veterinary Medicine. Citato da Woldehiwet Z. 2010.
  - Thyresson N. (1949): The penicillin treatment of acrodermatitis atrophicans chronica (Herxheimer). **Acta Derm. Venereol.**, 29: 572-621. Citato da Bhate C., Schwartz R. A., 2011.
  - Tibbles C. D., Edlow J. A. (2007): Does this patient have erythema migrans? **JAMA**, 297: 2617-2627.
  - Tielemans E., Manavella C., Pollmeier M., Chester T., Murphy M., Gale B. (2010): Comparative acaricidal efficacy of the topically applied combinations fipronil/(S)-methoprene, permethrin/imidacloprid and metaflumizone/ amitraz against *Dermacentor reticulatus*, the European dog tick (ornate dog tick, Fabricius, 1794) in dogs. **Parasite**, 17 (4): 343-348.
  - Tilly K., Rosa P. A., Stewart P. E. (2008): Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, 22: 217-34.
  - Toboada J. (1998): Babesiosis. In: **Green C.E.** (Ed.) Infectious diseases of dog and cat. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, 1998: pp 473-481.
  - Todorovic R. A., Long R. F. (1976): Comparison of in direct fluorescent antibody (IFA) with complement fixation (CF) tests for diagnosis of *Babesia* spp. Infections in Colombian cattle. **Zeitschrift fur Tropenmedizin und Parasitologie**, 27: 169-181.
  - Tomao P., Ciceroni L., D'Ovidio M. C., De Rosa M., Vonesch N., Iavicoli S., Signorini S., Ciarrocchi S., Ciufolini M. G., Fiorentini C., Papaleo B. (2005): Prevalence and incidence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* and to tick-borne encephalitis virus in agricultural and forestry workers from Tuscany, Italy. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 24: 457-463.
  - Tomlin C. (1994): The pesticide manual 10<sup>th</sup> Edition Crop protection Publication. (Citato da Keck, 1995).
  - Torina A., Alongi A., Naranjo V., Scimeca S., Nicosia S., Di Marco V., Caracappa S., Kocan K. M., de la Fuente J. (2008): Characterization of anaplasma infections in Sicily, Italy. **Ann N Y Acad Sci.**, 1149: 90-93.
  - Torina A., Galindo R. C., Vicente J., Di Marco V., Russo M., Aronica V., Fiasconaro M., Scimeca S., Alongi A., Caracappa S., Kocan K. M., Gortazar C., de la Fuente J. (2010): Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* and *A. ovis* infection in a naturally infected sheep flock with poor health condition. **Trop Anim Health Prod.**, 42(7):1327-31.
  - Trevejo R. T., Krause P. J., Sikand V. K., Schriefer M. E., Ryan R., Lepore T., Porter W., Dennis D. T. (1999): Evaluation of two-test serodiagnostic method for early Lyme disease in clinical practice. **J. Infect. Dis.**, 179: 931-938.
  - Trevisan G. (1987): Lyme disease in Italy. Zentralbl. Bakt. Hyg. A267: 459-463.
  - Troese M. J., Carlyon J. A. (2009): *Anaplasma phagocytophilum* densecored organisms mediate cellular adherence through recognition of human P-selectin glycoprotein ligand 1. **Infect. Immun.**, 77:4018-4027.
  - Trueman K. F., Blight G. W. (1978): The effect of age on resistance of cattle to *Babesia bovis*. **Aust. Vet. J.**, 54: 301-305.
  - Tsao J. I. (2009): Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles. **Vet. Res.**, 40: 36.
  - Tugwell P., Dennis D. T., Weinstein A., Wells G., Shea B., Nichol G., Hayward R., Lightfoot R.,

- Baker P., Steere A. C. (1997): Laboratory evaluation in the diagnosis of Lyme disease. **Ann. Intern. Med.**, 127: 1109–1123.
- Tuomi J. (1967a). Experimental studies on bovine tick-borne fever. 1. Clinical and haematological data, some properties of the causative agent, and homologous immunity. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, 70: 429–445. Citato da Woldehiwet Z., 2010.
  - Tuomi J. (1967b): Experimental studies on bovine tick-borne fever. 3. Immunological strain differences. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, 71: 89–100. Citato da Woldehiwet Z., 2010.
  - Tuomi J. (1967c): Experimental studies on bovine tick-borne fever. 2. Differences in virulence of strains in cattle and sheep. **Acta Pathol Microbiol Scand.**, 70(4): 577-589. Citato da Woldehiwet Z., 2010.
  - Tuomi J., von Bonsdorff C. H. (1966): Electron microscopy of tick-borne fever agent in bovine and ovine phagocytizing leukocytes. **J. Bacteriol.**, 92: 1478-1492.
  - Tuomi, J. (1967d): Experimental studies on bovine tick-borne fever. 5. Sensitivity of the causative agent to some antibiotics and to sulphonamides. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.** 71, 109–113. Citato da Woldehiwet Z., 2010.
  - Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T., Kondrusik M., Hermanowska- Szpakowicz T., Sawicki W., Sulek K. (2001): First case of acute human granulocytic ehrlichiosis in Poland. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 20: 196–198.
  - Uhnoo I., Cars O., Christensson D., Nystrom-Rosander C. (1992): First documented case of human babesiosis in Sweden. **Scand. J. Infect. Dis.**, 24: 541-547.
  - Urquhart G. M., Armour J., Ducan J. L., Dunn A. M., Jennings F. W. (1998): **Parassitologia Veterinaria**. UTET, Torino, pp 286-292.
  - van Dam A. P., Kuiper H., Vos K., Widjojokusumo A., de Jongh B. M., Spanjaard L., Ramselaar A. C., Kramer M. D., Dankert J. (1993): Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. **Clin. Infect. Dis.**, 17: 708–717.
  - Van Dobbenburgh A., van Dam A. P., Fikrig E. (1999): Human granulocytic ehrlichiosis in Western Europe. **N. Engl. J. Med.**, 340: 1214–1216.
  - Van Peenen P. F. D., Chang S. J., Bankneider A. R., Santana F. J. (1977): Piroplasms from Taiwanese rodents. **J. Protozool.**, 24: 310-312.
  - Vannier E., Krause P. J. (2009): Update on Babesiosis. **Interdiscip Perspect Infect Dis.**, Epub 2009 Aug 27.
  - Varde S., Beckley J., Schwartz I. (1998): Prevalence of tick-borne pathogens in *Ixodes scapularis* in a rural New Jersey County. **Emerg. Infect. Dis.**, 4: 97-99.
  - Vasiliu V., Herzer P., Rössler D., Lehnert G., Wilske B. (1998): Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato demonstrated by an ospA-type-specific PCR in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. **Med. Microbiol. Immunol.**, 187: 97-102.
  - Vázquez M., Muehlenbein C., Cartter M., Hayes E. B., Ertel S., Shapiro E. D. (2008): Effectiveness of personal protective measures to prevent Lyme disease. **Emerg Infect Dis.**, 14(2): 210-216.
  - Vázquez M., Muehlenbein C., Cartter M., Hayes E. B., Ertel S., Shapiro E. D. (2008): Effectiveness of Personal Protective Measures to Prevent Lyme Disease. **Emerg. Infect. Dis.**, 14: 210–216.
  - Vega F. E., Dowd P. F., Lacey L. A., Pell J. K., Jackson D. M., Klein M. G. (2000). Dissemination of beneficial microbial agents by insects. In: Lacey L.A., Kaya H.K. (Eds.) **Field Manual of Technique in Invertebrate Pathology**. Kluwer Academic Publishers, pp. 153–177
  - Vercammen F., De Deken R., Maes L. (1995): Clinical and serological observations on experimental infections with *Babesia canis* and its diagnosis using the IFAT. **Parasite**, 2: 407–410.
  - Vercruysse J., Parent R. (1981): Report of an account of porcine Babesiosis due to *Babesia perroncitoi* in Senegal. **Afr. Med.**, 20: 435.
  - Vermeil C., Menut J., Miegerville M., Cruziat J., Julienne F., Morin O., Roger A. P., Marjolet M., Bouillard C. (1983): Babesiosis, pediatric malaria: does confusion exist in Africa? **Bull. Soc.**

- Pathol. Exot. Filiales.**, 76: 797-804.
- Veronesi F., Galuppi R., Tampieri M. P., Bonoli C., Mammoli R. e Piergili Fioretti D. (2011): Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in fallow deer (*Dama dama*) and feeding ticks from an Italy preserve. **Res Vet Sci.**, 90(1): 40-43
  - Villee C.A., Walker W. F. JR, Barness R. D. (1978): General Zoology. Sounders Company, Philadelphia, USA, pp. 781-802.
  - Vitorino L. R., Margos G., Feil E. J., Collares-Pereira M., Ze-Ze L., Kurtenbach K. (2008): Fine-scale phylogeographic structure of *Borrelia lusitaniae* revealed by multilocus sequence typing. **PLoS One.**, 3(12): e4002.
  - Vogl U. M., Presterl E., Stanek G., Ramharter M., Gattringer K. B., Graninger W. (2010): First described case of human granulocytic anaplasmosis in a patient in Eastern Austria. **Wien Med Wochenschr.**, 160: 91-93.
  - von Loewenich F. D., Baumgarten B. U., Schröppel K., Geissdörfer W., Röllinghoff M. e Bogdan C. (2003): High diversity of ankA sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. **J. Clin. Microbiol.**, 41: 5033–5040.
  - Vorou R. M., Papavassiliou V. G., Tsiodras S. (2007): Emerging zoonoses and vector-borne infections affecting humans in Europe. **Epidemiol. Infect.**, 135(8): 1231-1247.
  - Vyas J. M., Telford S. R. e Robbins G. K. (2007): Treatment of refractory *Babesia microti* infection with atovaquoneproguanil in an HIV-infected patient: case report,” **Clin. Inf. Dis.**, 45: 1588–1590.
  - Wagner J.E. (1976): A fatal Cytauxzoonosis-like disease in cats. **JAVMA.** 168: 585-588.
  - Walder G., Falkensammer B., Aigner J., Tiwld G., Dierich M.P., Wurzner R., Lechleitner P. (2003): First documented case of human granulocytic ehrlichiosis in Austria. **Wien. Klin. Wochenschr.**, 11: 263–266.
  - Walker D. H., Raoult D. (2005): Rickettsia rickettsii and other spotted fever group rickettsiae (Rocky Mountain spotted fever and other spotted fevers). In: Mandell, G. L.; Bennett, J. E., Dolin, R. (Eds.). Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 6. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone, pp: 2287-95.
  - Walker J. B., Keirans J. E., Horak I. G. (2000): The Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae): a Guide to the Brown Ticks of the World. **Cambridge University Press**
  - Walker J.B., Olwage A. (1987): The tick vectors of Cowdria ruminantium (Ixodoidea, Ixodidae, genus *Amblyomma*) and their distribution. **Onderstepoort J Vet Res.**, 54: 353-379.
  - Wallace B. J., Brady G., Ackman D. M., Wong S. J., Jacqueline G., Lloyd E. E., Birkhead G. S. (1998): Human granulocytic ehrlichiosis in New York. **Arch Intern Med.**, 158: 769–773.
  - Walls J. J., Agüero-Rosenfeld M. E., Bakken J. S., Goodman J. L., Hossain D., Johnson R. C., Dumler J. S. (1999): Inter- and intralaboratory comparison of Ehrlichia equi and human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent strains for serodiagnosis of HGE by the immunofluorescent-antibody test. **J. Clin. Microbiol.**, 37: 2968-2973.
  - Walls J., Greig B., Neitze D., Dumler J. S. (1997): Natural infection of small mammal species in Minnesota with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, 35: 853–855.
  - Walsh C. A., Mayer E. W., Baxi L. V. (2007): Lyme disease in pregnancy: case report and review of the literature. **Obstet. Gynecol. Surv.**, 62: 41-50.
  - Wang G., Schwartz I. (2011): Genus II. Borrelia Swellengrebel 1907, 582. In Krieg N. R., Staley J. T., Brown D. R., Hedlund B. P., Paster B. J., Ward N. L., Ludwig W., Whitman W. B. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Volume four, Springer, New York, USA, pp. 484-498.
  - Wang G., van Dam A. P., Le Fleche A., Postic D., Peter O., Baranton G., de Boer R., Spanjaard L., Dankert J. (1997): Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). **Int. J. Syst. Bacteriol.** 47: 926-932.
  - Wang G., van Dam A. P., Schwartz I., Dankert J. (1999): Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. **Clin. Microbiol. Rev.**, 12: 633–653.

- Wang G., van Dam A. P., Spanjaard L., Dankert J. (1998): Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting analysis. **J. Clin. Microbiol.** 36: 768–776.
- Wang G., Wormser G. P., Schwartz I. (2001): *Borrelia burgdorferi*. In Sussman M. (Ed.): **Molecular medical microbiology**. Academic Press, London, United Kingdom. p. 2059–2092.
- Wang T., Malawista S. E., Pal U., Grey M., Meek J., Akkoyunlu M., Thomas V., Fikrig E. (2002): Superoxide anion production during *Anaplasma phagocytophila* infection. **J. Infect. Dis.**, 186: 274–280.
- Wang, G. (2002): Direct detection methods for the Lyme *Borrelia*, including the use of quantitative assays. **Vector Borne Zoon. Dis.**, 2: 227–235.
- Ware, G. W., (2000): *The Pesticide Book*, 5th edn. Fresno, CA: Thomson Publications.
- Watt J. A., Foster W. N. M., Cameron A. E. (1968): Benzathine penicillin as a prophylactic in tick pyemia. **Vet. Rec.**, 83: 507–508. Citato da Woldehiwet Z., 2006).
- Weber K. (1993): History of Lyme borreliosis in Europe. In: Weber K, Burgdorfer W, editors. **Aspects of Lyme borreliosis**. Berlin: Springer-Verlag, pp. 1-20. Citato da Bhate C., Schwartz R. A., 2011a.
- Weber K. (2001): Aspects of Lyme borreliosis in Europe. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 20: 6-13.
- Webster K. A. e Mitchell G. B. B. (1988): Use of counter immunoelectrophoresis in the detection of antibodies to tick-borne fever. **Res. Vet. Sci.**, 45: 28– 30.
- Weger W., Müllegger R. R. (2001): Histopathology and immunohistochemistry of dermatoborreliosis. *Acta Derm Venereol* (Ljubljana), 10: 135-42.
- Weisburg W. G., Dobson M. E., Samuel J. E. & other authors (1989): Phylogenetic diversity of the *Rickettsiae*. **J Bacteriol.**, 171: 4202-4206.
- Wen B., Rikihisa Y., Fuerst P. A. & Chaichanasiriwithaya W. (1995b): Diversity of 16S rRNA genes of new *Ehrlichia* strains isolated from horses with clinical signs of Potomac horse fever. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 45: 315-318.
- Wen B., Rikihisa Y., Mott J., Fuerst P. A., Kawahar, M. & Suto C. (1995a): *Ehrlichia muris* sp. nov., identified on the basis of 16S rRNA base sequences and serological, morphological, and biological characteristics. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 45: 250-254.
- Wenyon C.M. (1926): "Protozoology". Vol.1 Baylliere, Tindal and Cox, London
- Western K. A., Benson G. D., Gleason N. N., Healy G. R., Schultz M. G. (1970): Babesiosis in a Massachusetts resident. **N. Engl. J. Med.**, 283: 854-856.
- White D. J., Talarico J., Chang H.-G., Birkhead G. S., Heimberger T., Morse D. L. (1998): Human babesiosis in New York State: review of 139 hospitalized cases and analysis of prognostic factors. **Arch. Inter. Med.**, 19: 2149–2154.
- Whitehouse C. A. (2004): Crimean-Congo hemorrhagic fever. **Antivir. Res.**, 64: 145-160.
- Whitnall A. B. M., Mchardy W. M., Whitehead G. B., Meerholz F., (1951): Some observations on the control of the bont tick, *Amblyomma hebraeum* Koch. **Bull. Entomol. Res.**, 41: 577–591.
- Wieler L. H., Szattelberger C., Weiß R., Bauerfeind R., Kurtzer P., Failing K., Baljer G. (1999): Serum antibodies against particular antigens of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and their potential in the diagnosis of canine Lyme borreliosis. **Berl. Munch. Tierärztl. Wochenschr.**, 112: 465-471.
- Wikel K. S. (1999): Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. **Int. J. Parasitol.**, 29: 851-859.
- Willadsen P. (1980): Immunity to tick. **Advances in Parasitology**, 18: 293 262.
- Willadsen P. (2006): Tick control: thoughts on a research agenda. **Vet. Par.**, 138: 161–168.
- Willadsen P. (2008): Anti-tick vaccines. In: Bowman A.S. Nuttall P.A. (Eds.) **Ticks. Biology, Disease and Control**. Cambridge University Press, pp. 424-446.
- Willadsen P., Jongejan F. (1999): Immunology of the tick-host interaction and the control of tick and tick-borne diseases. **Parasitol. Today**, 15 (7): 258-262.
- Williams C. L., Strobino B., Weinstein A., Spierling P., Medici F. (1995): Maternal Lyme

- disease and congenital malformations: a cord blood serosurvey in endemic and control areas. **Paediatr. Perinat. Epidemiol.**, 9: 320-330.
- Wilske B. (2003): Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. **Vector Borne Zoonotic Dis.** 3: 215–227.
  - Wilske B., Fingerle V., Schulte-Spechtel U. (2007): Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, 49(1): 13-21.
  - Wilske B., Johnson B. J. B., Schriefer M. E. (2007b): *Borrelia*. In Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Landry M. L., Pfaller M. A. (Eds.): *Manual of Clinical Microbiology*, Volume 1, American Society for Microbiology, Washington DC, USA, pp: 971-986.
  - Wilske B., Preac-Mursic V. (1993): Microbiological diagnosis of Lyme borreliosis. In Weber K. e Burgdorfer W. (Eds.): **Aspects of Lyme borreliosis**. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 267–300. Citato da Aguero-Rosenfeld e coll., 2005.
  - Wilske B., Preac-Mursic V., Göbel U. B., Graf B., Jauris S., Soutschek E., Schwab E, Zumstein G. (1993): An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. **J. Clin. Microbiol.** 31: 340-350.
  - Wilske B., Zöller L., Brade V., Eiffert H., Göbel U. B., Stanek G., Pfister W. (2000): MIQ 12, Lyme-Borreliose. In Mauch H. e Lütticken R. (Eds.), **Qualitätsstandards in der Mikrobiologisch-Infektiologischen Diagnostik**. Urban & Fischer Verlag, Munich, Germany, pp: 1-59.
  - Wilske, B., Schriefer M. E. (2003): *Borrelia*, In Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Pfaller M. A., and Tenover F. C. (Eds.): **Manual of clinical microbiology**, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 937–954. Citato da Aguero-Rosenfeld e coll., 2005.
  - Wilson M. L., Spielman A. (1985): Seasonal activity of immature *Ixodes dammini*. **J. Med. Entomol.**, 4: 408-414.
  - Wilson M. L., Telford S. R. 3rd, Piesman J., Spielman A., (1988): Reduced abundance of immature *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) following elimination of deer. **J Med Entomol.**, 25(4): 224-228.
  - Wilson M.L. (1994): Population ecology of tick vectors: interaction, measurement and analysis. In: Sonenshine D.E. Mather T.N. (Eds.) *Ecological dynamics of tick-borne zoonoses*. Oxford University Press, pp.20-44.
  - Winslow G. M., Bitsaktsis C. (2005): Immunity to the ehrlichiae: New tools and recent developments. **Curr Opin Infect Dis.**, 18: 217–221.
  - Wittner M., Rowin K. S., Tanowitz H. B., Hobbs J. F., Saltzman S., Wenz B., Hirsch R., Chisholm E., Healy G. R. (1982): Successful chemotherapy of transfusion babesiosis. **Ann Intern Med.**, 96: 601-604.
  - Woese C. R., Kandler O. & Wheelis M. (1990): Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eukarya*. **Proc Natl Acad Sci USA**, 87, 4576-4579.
  - Wójcik-Fatla A., Szymańska J., Wdowiak L., Buczek A., Dutkiewicz J. (2009): Coincidence of three pathogens (*Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti*) in *Ixodes ricinus* ticks in the Lublin macroregion. **Ann. Agric. Environ. Med.**, 16(1): 151-158.
  - Woldehiwet Z. (2006): *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants in Europe. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1078: 446-460.
  - Woldehiwet Z. (2010): The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. **Vet. Parasitol.**, 167: 108-122.
  - Woldehiwet Z., Horrocks B. K. (2005): Antigenicity of ovine strains of *Anaplasma phagocytophilum* grown in tick cells and ovine granulocytes. **J. Comp. Pathol.**, 132: 322–328.
  - Woldehiwet Z., Horrocks B. K., Scaife H., Ross G., Munderloh U. G., Bown K., Edwards S. W. e Hart C. A. (2002): Cultivation of an ovine strain of *Ehrlichia phagocytophila* in tick cell culture. **J. Comp. Pathol.**, 127: 142-147.
  - Woldehiwet Z., Scott G. R. (1982a): Stages in the development of *Cytoecetes phagocytophila*,

- he causative agent of tick-borne fever in sheep. **J.Comp. Pathol.**, 92: 469-474.
- Woldehiwet Z., Scott G. R. (1982b). Differentiation of strains of *Cytoecetes phagocytophila*, the causative agent of tick-borne fever, by complement fixation. **J. Comp. Pathol.**, 92, 475–478. Citato da Woldehiwet Z., 2010.
  - Woldehiwet Z., Scott G. R. (1982c): Immunological studies on tick-borne fever in sheep. **J. Comp. Pathol.**, 92, 457–467. Citato da Woldehiwet Z., 2010.
  - Woldehiwet, Z., Scott G. R. (1993): Tick-borne (pasture) fever. In: Woldehiwet, Z., Ristic, M. (Eds.), **Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals**. Pergamon Press, Oxford, pp. 233–254. Citato da Woldehiwet Z., 2010.
  - Woldehiwet, Z., Scott, G.R., 1982e. Tick-borne fever: leukocyte migration inhibition. **Vet. Microbiol.**, 7, 437–455. Citato da Woldehiwet Z., 2010
  - Wong S. J., Brady G. S., Dumler J. S. (1997): Serological responses to *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Borrelia burgdorferi* in patients from New York State. **J. Clin. Microbiol.**, 35: 2198-2205.
  - Wong S. J., Thomas J. A. (1998): Cytoplasmic, nuclear, and platelet autoantibodies in human granulocytic anaplasmosis patients. **J Clin Microbiol.**, 36: 1959–1963.
  - Wong S., Grady L. J. (1996): Ehrlichia infection as a cause of severe respiratory distress. **N Engl J Med.**, 334: 273.
  - Wormser B. P., Liveris D., Nowakowski J., Nadelman R. B., Cavaliere L. F., McKenna D., Holmgren D., Schwartz I. (1999): Association of specific subtypes of *Borrelia burgdorferi* with hematogenous dissemination in early Lyme disease. **J. Infect. Dis.**, 180: 720-725.
  - Wormser G. P. (2006): Clinical practice. Early Lyme disease. **N. Engl. J. Med.**, 354: 2794-2801.
  - Wormser G. P., Bittker S., Cooper D., Nowakowski J., Nadelman R. B., Pavia C. (2000a): Comparison of the yields of blood cultures using serum or plasma from patients with early Lyme disease. **J. Clin. Microbiol.** 38: 1648–1650.
  - Wormser G. P., Brisson D., Liveris D, Hanincová K, Sandigursky S., Nowakowski J., Nadelman R. B., Ludin S., Schwartz I. (2008): *Borrelia burgdorferi* genotype predicts the capacity for hematogenous dissemination during early Lyme disease. **J. Infect. Dis.**, 198: 1358–1364.
  - Wormser G. P., Dattwyler R. J., Shapiro E. D., Dumler J. S., O'Connell S., Radolf J. D., Nadelman R. B. (2007): Single-dose prophylaxis against Lyme disease. **Lancet Infect. Dis.**, 7:371-373.
  - Wormser G. P., Dattwyler R. J., Shapiro E. D., Halperin J. J., Steere A. C., Klempner M. S., Krause P. J., Bakken J. S., Strle F., Stanek G., Bockenstedt L., Fish D., Dumler J. S., Nadelman R. B. (2006): The clinical assessments treatment, and prevention of lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.**, 43: 1089–1134.
  - Wormser G. P., Forseter G., Cooper D., Nowakowski J., Nadelman R. B., Horowitz H., Schwartz I., Bowen S. L., Campbell G. L., Goldberg N. S. (1992): Use of a novel technique of cutaneous lavage for diagnosis of Lyme disease associated with erythema migrans. **JAMA**, 268: 1311–1313.
  - Wormser G. P., Horowitz H. W., Nowakowski J., McKenna D. F., Dumler J.S., Varde S., Schwartz I., Carbonaro C., Aguero-Rosenfeld M. E. (1997): Positive Lyme disease serology in patients with clinical and laboratory evidence of human granulocytic ehrlichiosis. **Am. J. Clin. Pathol.**, 107: 142-147.
  - Wormser G. P., McKenna D., Carlin J., Nadelman R. B., Cavaliere L. F., Holmgren D., Byrne D. W., Nowakowski J. (2005): Brief communication: hematogenous dissemination in early Lyme disease. **Ann. Intern. Med.**, 142: 751-755.
  - Wormser G. P., Nadelman R. B., Dattwyler R. J., Dennis D. T., Shapiro E. D., Steere A. C., Rush T. J., Rahn D. W., Coyle P. K., Persing D. H., Fish D., Luft B. J. (2000b): Practice guidelines for the treatment of Lyme disease. **Infect. Dis. Soc. Am. Clin. Infect. Dis.**, 31(S1): 1–14.

- Wright I. G. (1973a): Osmotic fragility of erythrocytes in acute *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* infections in splenectomised *Bos taurus* calves: **Res. Vet. Sci.**, 15: 299-305.
- Wright I. G., Goodner B. V. (1973b): Proteolytic enzyme activity in the intra-erythrocyte parasites *Babesia argentina* and *Babesia bigemina*. **Z. Parasitenk.**, 42: 213-220.
- Xiong Q., Lin M. e Rikihisa Y. (2009): Cholesterol-dependent *Anaplasma phagocytophilum* exploits the low-density lipoprotein uptake pathway. *Plos Pathog*; 5(3): e1000329.
- Xiong Q., Wang X. e Rikihisa Y. (2007): High-cholesterol diet facilitates *Anaplasma phagocytophilum* infection and up-regulates macrophage inflammatory protein-2 and CXCR2 expression in apolipoprotein E-deficient mice. **J. Infect. Dis.**, 195: 1497–1503.
- Yabsley M. J., Murphy S. M., Luttrell M. P., Little S. E., Massung R. F., Stallknecht D. E., Conti L. A., Blackmore C. G., Durden L. A. (2008): Experimental and field studies on the suitability of raccoons (*Procyon lotor*) as hosts for tick-borne pathogens. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, 8: 491–503.
- Yeagley T. J., Reichard M. V., Hempstead J. E., Allen K. E., Parsons L. M., White M. A., Little S. E. Meinkoth J. H. (2009): Detection of *Babesia gibsoni* and the small *Babesia* spp. 'Spanish isolate' in confiscated pit bull terriers. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 235 (5): 535-539.
- Yoder A., Benoit J.B., Rellinger E.J., Tank J.L. (2006): Developmental profiles in tick water balance with a focus on the new Rocky Mountain spotted fever vector, *Rhipicephalus sanguineus*. **Med Vet Entomol**, 20: 365-372.
- Yoshiie K., Kim H.Y., Mott J. e Rikihisa, Y. (2000): Intracellular infection by the human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutrophil apoptosis. **Infect. Immun.** 68: 1125–1133.
- Young A. S., Leitch B. L. (1982): Epidemiology of East Coast fever: some effects of temperature on the development of *Theileria parva* in the tick vector, *Rhipicephalus appendiculatus*. **Parasitology**, 83: 199-211.
- Young A. S., Morzaria S. P. (1986): Biology of Babesia. **Parasitology today**, 2: 211-219.
- Young D. R., Arther R. G., Davis W. L. (2003): Valutazione comparativa dei trattamenti topici con K6 Advantix TM e con Frontline Plus per la repellenza delle zecche (*Rhipicephalus sanguineus*) sui cani. **Praxis Veterinaria**, 24 (4): 16-18.
- Yu X. J., Crocquet-Valdes P., Walker D. H. (1997): Cloning and sequencing of the gene for a 120-kDa immunodominant protein of *Ehrlichia chaffeensis*. **Gene**, 184: 149–154.
- Yu X. J., McBride J. W., Diaz C. M., Walker D. H. (2000a): Molecular cloning and characterization of the 120-kilodalton protein gene of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant 120-kilodalton protein for serodiagnosis of canine ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, 38: 369–374.
- Yu X., McBride J. W., Zhang X. e Walker D. H. (2000b): Characterization of the complete transcriptionally active *Ehrlichia chaffeensis* 28 kDa outer membrane protein multigene family. **Gene**, 248: 59–68.
- Yuval B., Spielman A. (1990): Duration and regulation of the developmental cycle of *Ixodes dammini*. **J. Med. Entomol.**, 27: 196-201.
- Zahler M., Rinder H., Schein E., Gothe R. (2000): Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. **Vet. Parasitol.**, 89: 241-248.
- Zahler M., Schein E., Rinder H., Gothe R. (1998): Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity in dogs. **Parasitol Res**, 84: 544-548.
- Zanconati F., Cattonar P., Grandi G. (1994): Histochemical and immunohistochemical methods for demonstration of spirochetes in skin biopsies. **Acta Derm Venereol (Ljubljana)**, 3: 99-104.
- Zaugg J. L. (1990): Babesiosis. In: Smith B.P. (Ed.) Large animal internal medicine. Mosby, St Louis, USA, 1990, pp 1217-1222.
- Zavizion B., Pereira M., de Melo Jorge M., Serebryanik D., Mather T. N., Chapman J., Miller N. J., Alford B., Bzik D. J., Purmal A. (2004): Inactivation of protozoan parasites in red blood cells using INACTINE PEN110 chemistry. **Transfusion**, 44: 731–738.

## Bibliografia

- Zeman P., Pazdiora P., Cinatl J. (2002): HGE antibodies in sera of patients with TBE in the Czech Republic. **Int. J. Med. Microbiol.** 33: 190–193.
- Zenner L., Gaillot E. D. (2003): Contrôle et lutte mécanique contre les tiques. **Le Point Vétérinaire**, 234: 30-33.
- Zhan L., Cao W. C., de Vlas S., Xie S. Y., Zhang P. H., Wu X. M., Dumler J. S., Yang H., Richardus J. H., Habbema J. D. (2008): A newly discovered *Anaplasma phagocytophilum* variant in rodents from southeastern China. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, 8: 369–380.
- Zhan L., Cao W. C., Jiang J. F., Zhang X. A., Liu Y. X., Wu X. M., Zhang W. Y., Zhang P. H., Bian C. L., Dumler J. S., Yang H., Zuo S. Q., Chu C. Y., Liu W., Richardus J. H., Habbema J. D. (2010): *Anaplasma phagocytophilum* from rodents and sheep, China. **Emerg. Infect. Dis.**, 16: 764–768.
- Zhang F., Gong Z., Zhang J., Liu Z. (2010): Prevalence of *Borrelia sensu lato* in rodents from Gansu, northwestern China. **BMC Microbiol.**, 10: 157.
- Zhang J. R., Hardham J. M., Barbour A. G., Norris S. J. (1997a): Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. **Cell**, 89: 275-285. (Erratum in: *Cell* 1999 Feb 5;96(3):447)
- Zhang J. Z., Popov V. L., Gao S., Walker D. H., Yu X. J. (2007): The developmental cycle of *Ehrlichia chaffeensis* in vertebrate cells. **Cell Microbiol.**, 9(3): 610-618.
- Zhang Y., Lafontant G., Bonner F. J. Jr. (2000): Lyme neuroborreliosis mimics stroke: a case report. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, 81: 519-521.
- Zhang Y., Ohashi N., Lee E. H., Tamura A., Rikihisa Y. (1997b): *Ehrlichia sennetsu* groEL operon and antigenic properties of the GroEL homolog. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, 18: 39-46.
- Zhi N., Ohashi N., Rikihisa Y. (1999) Multiple p44 genes encoding major outer membrane proteins are expressed in the human granulocytic ehrlichiosis agent. **J. Biol. Chem.**, 274: 17828–17836.
- Ziemer E. L., Keenan D. P., Madigan J. E. (1987): *Ehrlichia equi* infection in a New Jersey foal. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 190: 199–200.
- Zintl A. C., Mulcahy G., Skerrett H. E., Taylor S. M., Gray J. S. (2003): *Babesia divergens*, a Bovine Blood Parasite of Veterinary and Zoonotic Importance. **Clin. Microbiol. Rev.**, 16: 622-636.
- Zintl A. C., Westbrook G., Mulcahy G., Skerrett H. E., Gray J. S. (2002): Invasion and short- and long- term survival of *Babesia divergens* (Phylum Apicomplexa) cultures in nonbovine sera and erythrocytes. **Parasitology**, 124: 583-588.
- Zintl A., Gray J. S., Skerrett H. E., Mulcahy G. (2005): Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. **Parasite Immunol.**, 27: 115–120.
- Zwart D., Van Den Ende M. C., Kouwenhoven B., Buys J. (1968): The difference between *Babesia bigemina* and a Dutch strain of *B. major*. **Tijdschr. Diergeneesk.** 93: 126.

## Siti internet

- <http://maps.google.it/>
- <http://www.arpa.emr.it>
- <http://www.megasoftware.net>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- <http://www.parks.it/parco.gessi.bolognesi/pun.php>
- <http://www.biosci.ohio-state.edu/~acarolog/needham/tickgone.htm>